

N° d'ordre : 2603

Thèse

Présentée pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
TOULOUSE**

École doctorale : Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques et Bioingénieries.

Spécialité : Agrosystèmes, Ecosystèmes et Environnement

Par M^{elle} Marie CECCHI

DEVENIR DU PLOMB DANS LE SYSTEME SOL-PLANTE

**Cas d'un sol contaminé par une usine de recyclage du plomb et de
deux plantes potagères (Fève et Tomate)**

Soutenue le 26 mars 2008 devant le jury composé de :

Mr	Alain Bermond	Professeur AgroParisTech	Rapporteur
Mr	Jean-Louis Morel	Professeur INPL-ENSAIA	Rapporteur
Mr	Philippe Hinsinger	Directeur de Recherche INRA	Membre
Mr	Eric Pinelli	Professeur ENSAT	Président
Mr	Philippe Pradère	Directeur STCM	Membre invité
Mme	Camille Dumat	Maître de conférences ENSAT	Co-directrice de thèse
Mme	Maritxu Guiresse	Maître de conférences ENSAT	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier messieurs Alain Bermont et Jean-Louis Morel pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi que monsieur Philippe Hinsinger pour avoir accepté de participer au jury. Toutes leurs remarques et leurs conseils ont contribué à améliorer la qualité de ce travail. J'adresse également toute ma reconnaissance à Philippe Pradère, directeur de la STCM pour nous avoir permis d'accéder au site et d'effectuer les prélèvements de sol, ainsi que pour son soutien financier. Je le remercie de nous avoir aidés à mener ce travail à bien, ainsi que de nous avoir apporté son avis d'industriel averti en participant au jury de thèse.

Je voudrais ensuite adresser tous mes remerciements à Maritxu Guiresse et Camille Dumat, mes directrices de thèse, pour m'avoir aidée et guidée tout au long de ces années de thèse. Merci de m'avoir initiée au monde de la pédologie qui m'était inconnu jusque là, ainsi qu'aux rudiments de la chimie.

Je tiens à remercier Eric Pinelli, pour toutes les discussions partagées, scientifiques ou non, pour son aide et ses conseils depuis le DEA jusqu'à la fin de cette thèse, ainsi que pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Merci à Jean-Claude Revel pour son soutien pour l'obtention de la bourse qui a permis à cette thèse de voir le jour, mais également pour m'avoir initiée à la DRX ou encore à la fusion alcaline !

Je voudrais également remercier Jérôme Silvestre pour m'avoir accompagné dès mes débuts au laboratoire, pour son soutien et son aide. Un grand merci pour sa patience à toute épreuve, depuis le DEA et le fameux « Comet Assay » jusqu'aux coupes de dernière minute au microtome.

Merci à Alain Alric pour les nombreuses heures passées à l'ICP (pardon pour les dosages multi-élémentaires et les 10000 méthodes avec 3 échantillons!).

Je remercie également Georges Merlina, Séverine Jean, Florence Mouchet, Jean Kallerhoff ou encore Laury Gauthier pour leur présence et l'aide qu'ils ont pu m'apporter au fil des échanges.

Je ne peux oublier tous ceux qui rendent la vie plus légère et agréable au labo, à commencer par les occupants du bureau 202, Aurore, Geoff, Bouz et Thomas. Geoff, merci de m'avoir supportée (à tous les sens du terme !), aidée, encouragée, remotivée tout au long de ces années de thèse. Merci pour ta patience et pour tout ce qu'on a pu partager. Un grand merci à Bouz également, tout d'abord pour ton soutien et ton aide (précieuse à des moments clé comme la rédaction) mais aussi pour ta bonne humeur, ton humour (...) et toutes les bonnes soirées partagées. Merci à Aurore pour la touche de féminité salutaire pendant les 2 dernières années, dans ce bureau très masculin, pour toutes tes séances de remotivation (le parking de l'ENSAT s'en souviendra), pour toutes les heures de défoulement à la gym (ce soir il n'y aura pas de survivants !) et enfin pour toutes les après-midi thé et les soirées grillades (spéciale dédicace au Dav au passage). Un grand merci à Thomas, pour ta sympathie, ton calme olympien qui aide parfois à rester zen,

mais également pour ta disponibilité et ton aide que ça soit pour m'initier aux joies des extractions séquentielles ou de l'isotopie du plomb. Un tout aussi grand merci à Claire-Emmanuelle pour les cours d'excell, les heures à compter les micronoyaux, nos séances de motivation mutuelles en particulier dans la dernière ligne droite et enfin pour votre accueil dans le Gers. Je remercie aussi Gaëlle, la 2^{ème} madame plomb du labo, pour m'avoir souvent éclairée sur l'usine, le process et les particules, mais aussi pour ton soutien et tes conseils avisés. La liste ne serait pas complète sans remercier Tim (dit le benêt) pour avoir contribué à animer nos journées, Laure, Anne-Sophie, Sylvain, Mohamadou, Matthieu, Lobat, Victor, mais également Doyen pour la bonne ambiance les premières années et Boris qui nous a montré la voie.

Je ne remercierai jamais assez Annick, notre 2^{ème} maman à tous, qui se met toujours en 4 pour nous faciliter la vie dans les méandres du labo. Merci de m'avoir aidé à surmonter les coups de blues et moments difficiles, mais aussi pour tous les bons moments partagés.

De façon plus personnelle, je voudrais également remercier tous ceux qui, en dehors de l'ENSAT m'ont soutenu depuis plus ou moins longtemps et qui m'ont aidé chacun à leur manière à mener ce travail à bien. Marie, un grand merci pour ta présence, ton soutien inconditionnel, toutes les soirées filles et félicitations à toi aussi (2008 c'était notre année). Soumaya pour toutes ces années partagées, ton sens de l'organisation et ton soutien. Merci aussi à Stéphanie pour ta zen attitude lors de ces quelques mois de colloc, t'es la seule au monde à pouvoir venir à bout de mon stress. Merci à Anne, Paul et toute ma deuxième famille de cœur, toujours présents depuis près de 25 ans. Enfin, merci à Atrok (mon grand frère de cœur), Kaki, Nico (le cordon bleu), Fred (merci pour la conclusion générale et pour ton soutien quotidiens les derniers mois) ou encore à Alexia pour les moments sympathiques dans mon deuxième labo.

Je ne peux clore ces remerciements sans adresser toute mon affection et ma reconnaissance à ma famille. Une pensée pour les chiliens, ma famille du bout du monde. Merci à mes grands-parents, oncle, tante, cousins et petits cousins, toujours présent dans mon cœur malgré la distance nous séparant. J'en profite pour passer le flambeau à Matias, le prochain sur la liste des docteurs. Une pensée également pour la Catalogne, ma grand-mère, mon grand-père que je n'ai pas eu la chance de connaître, Cati et Léo, mes grand-tantes, et les cousins, Emma et le futur bébé, Bastien et Coline (le BAC ma coco !!!). Merci également à Gil, à Delphine et tout le reste de la « famille par alliance » !.

Et enfin et surtout tout mon amour à Manu, Caro et Daniel, et mes parents, pour leur soutien inconditionnel, leur patience (surtout les derniers mois), leurs nombreux encouragements et leur confiance en moi. C'est surtout grâce à vous que j'ai trouvé la force de me dépasser et d'arriver jusque là.

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une Allocation de Recherche du Ministère de l'Education et de la Recherche Technologique (octobre 2004-septembre 2007). Elle a par ailleurs bénéficié du soutien financier de la Société de Traitement Chimique des Métaux, qui nous a également permis l'accès au site contaminé, afin de réaliser les prélèvements de sol utilisés tout au long de l'étude.

L'ensemble de ces travaux ont abouti à la rédaction de deux publications :

- Multi-metal contamination of a calcic Cambisol by fallout from lead recycling plant. **M. Cecchi**, C. Dumat, A. Alric, R. Bidegain, P. Pradere and M. Guiresse. *Geoderma* (2008), 144 (1-2): 287-295.
- Fate of lead in the soil-plant system of *Vicia faba* and *Lycopersicon esculentum* cultivated on a contaminated calcareous soil. **M. Cecchi**, M. Guiresse and C. Dumat. Soumis à *Water, Air and Soil pollution*, 2008.

Ils ont également fait l'objet de communications par poster dans deux colloques :

- Study of lead impact and behavior in the soil-plant system. Case of *Vicia faba* and *Pelargonium* cultivated on a calcareous soil contaminated by lead recycling plant fallouts. **M. Cecchi**, M. Guiresse, J. Silvestre, P. Pradère, E. Pinelli & C. Dumat. Difpolmine Conférence (ADEME), 12-14 Décembre 2006 (Poster+ rédaction d'un article de 10 pages pour les actes du colloque).
- Lead behavior in a contaminated calcic cambisol profile. **M. Cecchi**, C. Dumat, P. Pradère, R. Bidegain, J.C. Revel, E. Pinelli & M. Guiresse. 18th world congress of soil sciences. Philadelphia, USA. July 9th-14th 2006 (Poster)

Par ailleurs, j'ai pu bénéficier d'un poste de monitrice de l'enseignement supérieur durant ces 3 années de thèse. J'ai réalisé mes trois années d'enseignement à l'ENSAT, sous la direction de Pierre Maury, principalement dans les deux premières années du cycle ingénieur. J'ai effectué les travaux dirigés et les travaux pratiques dans l'unité **Phytotechnie** (Principes généraux d'agronomie, Croissance et développement des végétaux cultivés, Interactions plante/environnement). Les principaux travaux dirigés auxquels j'ai participé portaient sur la photosynthèse nette (paramètre d'analyse de la croissance), la caractérisation de l'état hydrique des plantes (système sol – plante - atmosphère), ainsi que sur l'étude des effets des différents facteurs sur la phase de germination et de levée du maïs.

Tous ces enseignements se déroulaient sur du matériel végétal vivant, qui nécessitait donc un semis au départ, puis un suivi régulier d'irrigation, et de protection contre les maladies parfois. Cette tâche m'était entièrement impartie, et je tiens d'ailleurs par ces quelques lignes à remercier profondément Patricia Nouri, technicienne au laboratoire, pour son aide constante et précieuse concernant cette préparation du matériel végétal, ainsi que du matériel pour les séances de TD. De plus, j'étais chargée de la correction de l'ensemble des comptes-rendus de travaux dirigés rendu à la fin des séances.

Ce poste de monitrice m'a également permis de bénéficier des formations du **C**entre d'Initiation à l'**E**nseignement **S**upérieur de Midi-Pyrénées, qui ont été pour la majeure partie, profitables, et m'ont initié au monde universitaire, que l'on croit bien connaître, mais qui est en réalité beaucoup plus complexe. C'était l'occasion de réfléchir véritablement sur le métier d'enseignant chercheur, de prendre du recul sur cette fonction, et même, en général de discuter sur de nombreux sujets.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES.....	3
LISTE DES TABLEAUX.....	6
INTRODUCTION GENERALE.....	7
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
1 Propriétés physico-chimiques du plomb	12
2 Origines dans l'environnement et utilisations du plomb.....	14
2.1 Plomb naturellement présent dans l'environnement (fond géochimique)	14
2.2 Sources anthropiques	15
2.2.1 Histoire de l'utilisation du plomb	15
2.2.2 Différentes utilisations du plomb	15
2.2.3 Quelques données économiques	17
2.2.4 Cycle biogéochimique.....	17
3 Toxicité du plomb pour l'homme	19
3.1 Voies d'exposition	19
3.2 Valeurs limites réglementaires	19
3.3 Effets toxiques chez l'homme	22
4 Le plomb dans le sol.....	24
4.1 Généralités et concepts de base	24
4.2 Associations avec les différents constituants du sol.....	24
4.2.1 Interactions avec les oxydes de fer et de manganèse.....	24
4.2.2 Interactions avec les argiles.....	26
4.2.3 Interactions avec les carbonates et les phosphates	26
4.2.4 Interactions avec les matières organiques du sol (MOS)	27
4.3 Spéciation en phase aqueuse.....	27
4.3.1 Complexes inorganiques	28
4.3.2 Complexes organiques	29
4.4 Mobilité du plomb	29
4.4.1 Influence des paramètres physico-chimiques sur la spéciation du plomb.....	30
4.4.1.1 Influence du pH.....	30
4.4.1.2 Influence du potentiel redox	30

4.4.1.3	Influence de la composition minéralogique du sol.....	30
4.4.1.4	Influence des ligands présents dans la phase aqueuse	31
4.4.1.5	Influence de la fraction colloïdale.....	31
4.4.2	Influence des microorganismes sur la spéciation du plomb	31
4.4.3	Influence des plantes sur la spéciation du plomb	31
4.5	Les outils d'investigation.....	31
5	Le plomb dans le système sol-plante.....	35
5.1	Définition de la rhizosphère.....	35
5.2	Mécanismes d'interaction sol-plante : impact des activités racinaires	36
5.2.1	Modification du pH.....	36
5.2.2	Modification des concentrations ioniques dans la rhizosphère.....	37
5.2.3	Exsudation d'acides organiques dans la rhizosphère	37
5.2.3.1	Définition	37
5.2.3.2	Nature.....	37
5.2.3.3	Rôle	38
5.3	Réaction entre les acides organiques et les métaux dans la rhizosphère.....	38
6	Le plomb dans la plante.....	40
6.1	Notion de phytodisponibilité	40
6.2	Absorption	41
6.2.1	Structure des racines.....	41
6.2.2	Mécanismes d'absorption	42
6.3	Transfert du plomb du sol vers les racines	44
6.4	Translocation du plomb des racines vers les parties aériennes.....	45
6.5	Toxicité.....	46
6.5.1	Action sur les activités enzymatiques.....	47
6.5.2	Effets sur la nutrition minérale.....	47
6.5.3	Stress hydrique.....	47
6.5.4	Génération de stress oxydant.....	47
6.5.5	Croissance et morphogénèse	48
6.5.6	Altération de l'ADN due au stress oxydant.....	49
6.5.7	Test des micronoyaux.....	51
6.6	Mécanismes de tolérance	52
7	Synthèse et conclusions.....	55
PARTIE II : MATERIELS ET METHODES.....		58
1	Site d'étude.....	59
1.1	Description de l'usine.....	59
1.2	Activité	59

1.3	Localisation	60
2	Prélèvement des échantillons.....	61
2.1	Fosse pédologique	61
2.2	Prélèvement des échantillons.....	61
2.3	Préparation des échantillons	63
2.4	Echantillons.....	63
3	Analyses de sol.....	63
4	Expériences de culture sur sol contaminé	65
4.1	Choix des espèces végétales	65
4.1.1	La fève	65
4.1.2	La tomate.....	65
4.2	Dispositif de culture employé	66
4.3	Minéralisation des végétaux et dosages du plomb.....	67
PARTIE III : COMPORTEMENT DU PLOMB LE LONG DU PROFIL DU SOL		69
Chapitre I Approche pédologique		70
1	Introduction	70
2	Présentation des principales analyses	70
2.1	Approche pédologique.....	70
2.2	Eau régale.....	71
2.3	Extractions séquentielles	71
2.3.1	Phase soluble à l'eau (Pb Eau)	72
2.3.2	Extraction au Nitrate de Magnésium (Pb NMg)	72
2.3.3	Extraction à l'Acétate de Sodium (Pb AS)	73
2.3.4	Extraction au Chlorure d'Hydroxylamine (Pb CH)	73
2.3.5	Extraction à l'Oxalate d'Ammonium et Acide Oxalique (Pb OA)	73
2.3.6	Extraction à l'Oxalate d'Ammonium, Acide Oxalique et Acide Ascorbique (Pb OAAA).....	73
2.3.7	Extraction à l'acide nitrique (HNO ₃) et eau oxygénée (H ₂ O ₂) (Pb AA)	74
2.3.8	Fraction résiduelle	74
2.4	Dosage.....	74
3	Méthodologie générale employée dans ce chapitre	75
4	Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead recycling plant.....	76
4.1	Introduction and context	78
4.2	Material and Methods	79
4.2.1	Pedological analyses.....	79
4.2.2	Complementary analyses	80
4.2.3	Study site	81

4.3	Results and discussion	82
4.3.1	Pedological and physical-chemical characteristics of the soil profile (table 2 and 3).	82
4.3.2	Solum trace element pattern	87
4.3.3	Relations between trace metals and metalloids versus major elements.....	89
4.3.3.1	Constant relation with iron along the profile: nickel and chromium	89
4.3.3.2	Relation with iron perturbed in surface	90
4.3.4	Modelling multi-metallic contamination	95
4.4	Conclusions and Perspectives	97
Chapitre II	Autres méthodes d'investigation du plomb dans le sol	101
1	Extractions totales à l'acide fluorhydrique	101
1.1	Comparaison entre l'extraction à l'eau régale et celle à l'acide fluorhydrique	101
1.2	Facteur d'enrichissement.....	103
1.3	Apports anthropiques calculés selon l'approche pédologique	106
2	Isotopie du plomb.....	108
2.1	Introduction	108
2.2	Mesures	109
2.3	Résultats.....	110
3	Apport de la microscopie électronique à balayage et de la microsonde à l'étude du sol de surface ..	113
3.1	Identification des phases métalliques présentes dans le sol par microscopie électronique à balayage couplée à l'analyse chimique.....	113
3.1.1	Conditions expérimentales.....	113
3.1.2	Résultats	115
3.2	Composition chimique des phases présentes dans le sol, identifiée par microsonde électronique.	118
3.2.1	Conditions expérimentales.....	118
3.2.2	Analyses.....	119
3.2.3	Résultats obtenus	120
	Conclusion.....	128
	PARTIE IV : ETUDE DU TRANSFERT SOL-PLANTE.....	130
1	Introduction	131
2	Matériels et méthodes	133
2.1	Espèces végétales	133
2.2	Dispositif de microculture.....	133
2.3	Protocole expérimental	134
2.3.1	Phase de pré-culture	134
2.3.2	Phase de culture sur le sol	135

3	Méthodologie générale	137
4	Fate of lead in the soil-plant system of <i>Vicia faba</i> and <i>Lycopersicon esculentum</i> cultivated on a contaminated calcareous soil.	138
4.1	Introduction and context	140
4.2	Material and Methods	141
4.2.1	Site description, soil sampling and analysis.....	141
4.2.2	Plant biotest	142
4.2.3	Plant analyses	143
4.2.4	Calculations	143
4.2.5	Assay of lead associated with soil components using the sequential extractions.	143
4.2.6	Statistical analysis.....	144
4.3	Results.....	145
4.3.1	Plant biomass and lead uptake.....	145
4.3.1	Lead in the rhizosphere soils: comparison of the pH and sequential extraction results obtained in bulk and rhizospheric soil	147
4.4	Discussion.....	148
4.4.1	Growth of plants in relation with culture conditions	148
4.4.2	Lead uptake by plants.....	149
4.4.2.1	Lead adsorbed onto roots.....	149
4.4.2.2	Bioconcentration factor.....	149
4.4.2.3	Translocation factor.....	150
4.4.3	Influence of the plants on the behavior of metals in their rhizosphere.....	151
4.4.4	Transfer of lead in the soil-plant system	152
4.5	Conclusions and Perspectives	154
4.6	Acknowledgements.....	154
4.7	References	154
5	Conclusions et perspectives.....	157
PARTIE V : IMPACT DU PLOMB ABSORBE PAR LA PLANTE.		161
COMPARAISON DE DEUX MODES DE CULTURE : SOL ET HYDROPONIE.....		161
1	Introduction	162
2	Matériel et méthodes	164
2.1	Conditions de l'expérience.....	164
2.2	Test des micronoyaux	165
2.2.1	Test en hydroponie.....	165
2.2.2	Test des micronoyaux par exposition directe au sol	166
2.2.3	Statistiques	167

2.3	Transfert sol/plante	168
2.4	Microscopie.....	168
2.5	Analyses de sève	169
3	Résultats	169
3.1	Test des micronoyaux	169
3.2	Transfert sol/plante	172
3.3	Dosage du plomb dans la sève.....	175
3.4	Microscopie.....	177
4	Conclusion.....	181
CONCLUSION GENERALE.....		183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		191
ANNEXES.....		205

Liste des Abréviations

ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFNOR	Association Française de NORmalisation
ANOVA	Analysis Of Variance
BCF	BioConcentration Factor (facteur de transfert)
BCR	Bureau Communautaire de Référence
BRGM	Bureau de Recherche Géologiques et Minières
CEC	Capacité d'Echange Cationique
CNAM	Conservatoire national des arts et métiers
DGT	Diffusive Gradient Thin film
DM	Dry matter
DOC	Disolved Organic Carbon
DRX	Diffraction des Rayons X
DTPA	Acide Diéthylène TriaminoPentaacétique
EDS	Energy Dispersive Spectrometry
EDTA	Acide Ethylène DiaminoTétraacétique
EDX	Energy-Dispersive X-ray spectrometry
EN	Elément Normalisant
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ETM	Elements Trace Métallique
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
FE	Facteur d'Enrichissement
FT	Facteur de translocation
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HF	Acide Florhydrique
HM	Hydrazide Maléique
ICP-OES	Induced Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry
ICP-MS	Induced Coupled Plasma-Mass Spectrometry
IM	Indice Mitotique
INERIS	Institut National de l'EnviRonnement industriel et des rISques
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
ISA	Institut Supérieur d'Agriculture (Lille)
ISO	International Standards Organization
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs und Forschungs – Anstalt
LWMOA	Low Weight Molecular Organic Acids
MEB	Microscope Electronique à Balayage

Liste des Abréviations

MET	Microscope Electronique à Transmission
MN	Micronoyaux
MOS	Matière Organique du Sol
MS	Matière Sèche
OHSAS	Occupational Health and Safety Assessment
PCB	PolyChloroBiphényles
PVC	Polychlorure de Vinyle
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances
RMQS	Réseau de Mesure de la Qualité des Sols
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
STCM	Société de Traitement Chimique des Métaux
UHQ	Ultra Haute Qualité

Liste des figures

Figure 1 : Cycle biogéochimique des éléments (adapté de Lamand et al, 1991)	18
Figure 2 : Diagramme pH/Eh du système plomb-eau à 25°C (d'après BRGM, 2004).....	28
Figure 3: Distribution des espèces aqueuses du plomb en fonction du pH (d'après BRGM, 2004).....	29
Figure 4 : Interactions chimiques ayant lieu dans la rhizosphère (Hinsinger, 2001).....	36
Figure 5 : Coupe longitudinale de racine (Gobat et al., 1998)	42
Figure 6 : Coupe transversale de racine, avec le passage des ions selon les voies symplastiques et apoplastiques (Gobat et al, 1998).	43
Figure 7 : Dynamique des éléments traces métalliques dans le système sol/plante (d'après Alloway, 1995).....	56
Figure 8: Localisation des différentes usines de la STCM en France.....	59
Figure 9: Localisation du site d'étude	60
Figure 10: Réalisation de la fosse pédologique	61
Figure 11 : Profil de sol prélevé.....	62
Figure 12 : observation et description directe du profil de sol réalisée sur le terrain lors des prélèvements.	62
Figure 13: Principe de la procédure d'extractions chimiques séquentielles	64
Figure 14: Gousse, tiges, feuilles et fleurs de <i>Vicia faba</i>	65
Figure 15 : Plans et fruits de tomates.....	66
Figure 16 : Schéma de présentation du dispositif de microculture utilisé	67
Figure 17 : Photographie de la plaque de minéralisation et des tubes à minéraliser utilisés pour les échantillons de végétaux.	67
Figure 18 : gradient décroissant de pH au long de la procédure d'extraction séquentielle utilisée avec (1) fraction hydrosoluble ; (2) fraction échangeable ; (3) fraction liée aux carbonates ; (4) fraction liée aux oxydes de manganèse ; (5) fraction liée aux oxydes de fer amorphes ; (6) fraction liée aux oxydes de fer cristallins ; (7) fraction liée à la matière organique.	72
Figure 19 : Concentrations en plomb obtenues après digestion à l'eau régale et après attaque à l'HF en fonction de la profondeur.....	102
Figure 20 : Relation linéaire entre les concentrations en plomb obtenues après digestion à l'eau régale et après attaque à l'HF pour les divers échantillons le long du profil du sol (avec n=13 et p=0).....	103
Figure 21 : Evolution du facteur d'enrichissement du plomb en fonction de la profondeur.	105
Figure 22 : Pourcentage de plomb anthropique calculé selon les deux approches.....	107
Figure 23 : Teneurs en plomb anthropique calculées selon les deux approches.....	107
Figure 24 : Rapports isotopiques des échantillons de sol et signatures isotopiques de différentes sources.	111
Figure 25 : Photographie et schéma d'un MEB.....	114
Figure 26 : Spectre EDS montrant le plomb associé aux phosphates, au calcium et à l'argile.....	115

Liste des figures

Figure 27 : Spectre EDS montrant le plomb associé au fer, au manganèse et à l'argile.	116
Figure 28 : Spectre EDS montrant Pb associé à Sb, Sn, Fe, Cu et à l'argile	117
Figure 29 : Spectre EDS montrant Pb associé à Sn, Fe, Cu, Zn et à l'argile	117
Figure 30 : Schéma et photographie de la microsonde	119
Figure 31 : Vue générale de la lame mince (3.5 x 2.6 cm) de l'échantillon 0-10cm observée à la loupe binoculaire	119
Figure 32 : Image de la zone 3 obtenues en MEB, et localisation des 5 points d'analyses	120
Figure 33 : Corrélation entre les teneurs en K et celles en plomb dans tous les points d'analyse.....	122
Figure 34 : Image de la zone 51 obtenues en MEB, et localisation des points d'analyses, avec un agrandissement du grain où s'est concentrée l'analyse (cartographies ci-dessous).....	123
Figure 35 : Cartographie de la zone 51 réalisée en microsonde, sur le grain central riche en silice et argile (concentrations croissantes du noir au blanc).....	123
Figure 36 : Image de la zone 6 obtenues en MEB, et localisation des 5 points d'analyses	125
Figure 37 : Cartographie de la zone 6 réalisée en microsonde, avec des concentrations croissantes du noir au blanc.	125
Figure 38 : Image de la zone 42 obtenues en MEB, et localisation des 3 points d'analyses	126
Figure 39 : Cartographie de la zone 42 réalisée en microsonde au niveau du point 1	126
Figure 40 : Procédé d'affinage du plomb (d'après le programme des nations unies pour l'environnement)	129
Figure 41: Schéma du dispositif de microculture	133
Figure 42 : Cylindres en PVC ainsi que des bacs permettant la culture des plantes	134
Figure 43 : Tapis racinaire obtenu après la phase de microculture	134
Figure 44 : Tomates (à gauche) et fèves (à droite) après respectivement 3 et 2 semaines de préculture en hydroponie, au moment de l'exposition au sol	135
Figure 45 : Plaques de PVC permettant de déposer la fine couche de sol au-dessous d'un réservoir d'eau permettant l'alimentation hydrique des plantes.	135
Figure 46 : Contact entre le cylindre en PVC contenant la plante et la fine couche de sol.	136
Figure 47 : Tomates (à gauche) et fèves (à droite), après les 8 jours de contact avec le sol, au moment de la récolte.	136
Figure 48 : Teneurs en plomb en fonction des concentrations en calcium dans les feuilles	158
Figure 49 : Teneurs en plomb en fonction des concentrations en calcium dans les racines.....	159
Figure 50 : Méthodologie adoptée pour l'évaluation des effets génotoxiques du plomb	165
Figure 51 : photos de graines de <i>Vicia faba</i> en phase de germination (à gauche), puis en hydroponie au phytotron (à droite)	166
Figure 52 : Cellules racinaires de <i>Vicia faba</i> après préparation selon le protocole normalisé.	167
Figure 53 : Concentrations en plomb total dans la sève (mg L^{-1}), les feuilles et les racines ($\text{mg kg}^{-1}\text{MS}$) des fèves selon les deux modes de culture.	173
Figure 54 : Comparaison des concentrations en plomb dans la sève selon les deux modes de culture	175

Liste des figures

Figure 55 : Comparaison des concentrations en plomb libre et labile dans la sève (mg L^{-1}) et du plomb total dans les feuilles et les racines (mg kg^{-1} MS)	176
Figure 56 : Apex racinaires de <i>Vicia faba</i> observés au microscope, au grossissement x10	178
Figure 57 : Coupes de racines Témoin Hydroponie (grossissement x40 et x63).	179
Figure 58 : Coupes de racines Plomb Hydroponie (grossissement x40 et x63).	179
Figure 59 : Coupes de racines Témoin Sol (grossissement x40 et x63).	180
Figure 60 : Coupes de racines Plomb Sol (grossissement x40 et x63).	180

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales propriétés physico-chimiques du plomb	12
Tableau 2 : Principaux minéraux et composés de plomb (BRGM, 2004)	14
Tableau 3 : Evolution de la production primaire de plomb de 1975 à 2003, en kt par an.....	17
Tableau 4 : Voie d'exposition au plomb chez l'homme (d'après BRGM, 2004).....	19
Tableau 5 : Valeur de teneurs limites en plomb dans les eaux de consommation et dans l'air (d'après Pichard, 2002 et adapté par BRGM, 2004)	20
Tableau 6 : Valeurs réglementaires en vigueur dans les denrées alimentaires pour le plomb (les teneurs s'appliquant à la partie comestible des denrées alimentaires mentionnées). (INERIS, 2006). 20	
Tableau 7 : Modes opératoires des techniques d'extractions séquentielles les plus utilisées	34
Tableau 8 : Concentrations en plomb obtenues après digestion à l'eau régale et après attaque à l'HF le long du profil du sol.....	102
Tableau 9 : Facteur d'enrichissement et répartition du plomb anthropique en référence au Th (équations (1) à (4)).....	105
Tableau 10 : Répartition du plomb anthropique calculé selon l'approche pédologique.....	106
Tableau 11 : Signatures isotopiques de diverses sources émettrices de plomb	109
Tableau 12 : Rapports isotopiques mesurés le long du profil de sol.....	110
Tableau 13: Composition chimique des différents points d'analyse de la microsonde. Les zones de nature minéralogique homogène sont surlignées de couleur. Les numéros de points soulignés ont fait l'objet d'une cartographie des éléments.....	121
Tableau 14 : Comparaison des BCF calculés en considérant la teneur en plomb dans les plantes entières ou dans les feuilles.	158
Tableau 15 : Caractéristiques des sols utilisés lors de l'essai de génotoxicité.....	164
Tableau 16: Résultats du test des micronoyaux après exposition à des lixiviats	170
Tableau 17: résultats du test des micronoyaux après 2 jours de contact direct avec le sol	170
Tableau 18 : Teneurs en plomb et translocation (TF) dans les végétaux après 30h d'exposition aux lixiviats	172
Tableau 19 : Teneurs en plomb et translocation (TF) dans les végétaux après 2 jours de contact direct avec le sol contaminé	172
Tableau 20 : Teneurs en plomb total dans la sève des <i>Vicia faba</i> cultivées en sol et en hydroponie (dosage par ICP-OES).	175
Tableau 21 : Teneurs en plomb libre et labile dans la sève des <i>Vicia faba</i> cultivées en sol et en hydroponie.....	176
Tableau 22 : Récapitulatif des différentes questions à l'origine de ces travaux ainsi que des réponses apportées et des hypothèses proposées.	190

Introduction générale

Les sols contaminés par le plomb sont très nombreux car cet élément a été utilisé dans des secteurs industriels variés depuis des siècles : canalisations anciennes de distribution des eaux, extraction minière, carburants automobiles, peintures, installations de transformation ou recyclage des déchets, accumulateurs, soudures, sertissage, protection contre les rayonnements, tir et chasse, etc... La présence de plomb dans les déchets en particulier, peut entraîner une contamination des sols et la réduction des possibilités de valorisation et de recyclage des déchets (compostage de déchets, épandage des boues, valorisation des mâchefers en sortie d'incinération...) (AGHTM, 1996; Miquel, 2001). Ce phénomène pose un problème environnemental, car le plomb est classé parmi les métaux potentiellement toxiques (anémie, hypertension artérielle, saturnisme, etc.) pour l'homme (Pichard, 2002) et cet élément persistant s'accumule dans les sols (Baize, 1997). Une fois le sol contaminé, le plomb peut être transféré aux écosystèmes et donc représenter un danger pour la santé humaine.

La mobilité du plomb dans le sol est généralement considérée comme faible, mais elle dépend des conditions bio-physico-chimiques du milieu: un sol acide et la présence de ligands organiques peuvent favoriser son transfert vers les plantes. En raison de la complexité du système sol-plante des interrogations demeurent encore concernant la compréhension des mécanismes qui gouvernent la mobilité du plomb dans les sols et son absorption par les plantes.

Le plomb accumulé dans le sol de surface peut donc être prélevé par les plantes, et par conséquent contaminer l'homme via la chaîne alimentaire, ce qui constitue un problème sanitaire majeur. En effet, les hommes sont encouragés à consommer de plus en plus de fruits et légumes. Ceux-ci sont riches en vitamines, en éléments minéraux mais surtout en fibres et autres molécules antioxydantes qui ont des effets bénéfiques sur la santé humaine. Des travaux de recherche sont donc nécessaires pour répondre aux attentes dans les domaines de la phytoremédiation des sols (Cunningham et Berti, 1993) et surtout de la sécurité alimentaire (plantes potagères cultivées dans des jardins proches d'installations industrielles par exemple). En effet, il faut pouvoir s'assurer de l'innocuité des végétaux destinés à être consommés par les êtres humains.

En raison de sa toxicité, les rejets de plomb sont contrôlés de nos jours et les principales utilisations (essence et peinture) sont interdites. Mais le plomb est toujours utilisé pour la fabrication des batteries et de plus cet élément persistant s'est accumulé dans les horizons de surface des sols en raison de la forte affinité du Pb pour les matières organiques (Harter & Naidu, 1995; De Matos et al., 2001). Dans les sols, le plomb peut induire une dégradation de l'activité biologique (Dumat et al., 2006) et de la qualité des eaux et des plantes. En comparaison avec d'autres éléments plus mobiles (Zn et Cu), seulement quelques études concernent les mécanismes du transfert sol-plante du Pb et la phytoremédiation des sols contaminés par le plomb.

Au vu de la dispersion et de la persistance du plomb dans l'environnement, ainsi que du risque qu'il représente, la législation devient de plus en plus exigeante. Le règlement européen CE n°1907/2006 REACH (Registration Authorisation and Evaluation of CHemicals) vise à avoir une réglementation commune à toute la communauté européenne en matière de gestion des substances chimiques sur l'ensemble du cycle de vie (Conseil de l'Union Européenne, 2006). Son but est de

référencer les produits chimiques ainsi que les risques qu'ils représentent, et ainsi de réglementer leur utilisation.

Objectifs de la thèse

Nous avons donc choisi de suivre le comportement du plomb le long du profil d'un sol proche d'une entreprise de recyclage de batteries et d'étudier le transfert sol-plante pour des plantes potagères de consommation courante. L'objectif de cette thèse est de déterminer les formes mobiles et de stockage du plomb depuis le sol (phase solide et solution du sol) vers les racines, puis la sève et enfin les parties aériennes des plantes par une approche pluridisciplinaire (pédologie, biologie, physiologie végétale et physicochimie) et le couplage de techniques variées (extractions chimiques, microscopies, suivi des caractéristiques du sol) :

➤ Le premier objectif de ces travaux était d'étudier le devenir et la mobilité du plomb sur le sol du site industriel de recyclage du plomb, le long d'un profil pédologique. Les mécanismes prépondérants pour le devenir du plomb (associations avec les constituants du sol, répartition entre phase solide et solution du sol, lessivage, etc.) ont été recherchés grâce à une approche pédologique globale qui nous a permis de comprendre l'affinité du plomb pour les phases organo-minérales du sol.

Le profil du sol a été échantillonné tous les 10cm, dans une zone de forte pollution. La caractérisation pédologique complète de chaque échantillon (pH, capacité d'échange cationique, teneur en matière organique, granulométrie, teneur en éléments majeurs et traces...) a permis de déterminer les conditions physico-chimiques de l'expérimentation, et de connaître le comportement du plomb au sein du profil. Ces travaux sont dans le prolongement de la thèse de Gavalda (2001) qui avait mis en évidence des phases porteuses pour les éléments traces dans un sol non contaminé. Nos résultats obtenus avec la même approche seront complétés par des analyses des isotopes du plomb, puis par des expériences de transfert sol-plante dans un deuxième temps, menées en laboratoire, en conditions contrôlées.

➤ Le sol a ensuite été utilisé pour des expériences de transfert sol-plante du plomb au laboratoire afin de renseigner les mécanismes mis en jeu au niveau de la rhizosphère, dans le prolongement des thèses de Diyab (2005, UPMC) et Ferrand (2005, UPMC). De nombreuses études ont été menées sur les transferts des contaminants du sol vers les plantes, mais ce sont souvent des études soit en hydroponie, soit sur du sol contaminé artificiellement. Le deuxième objectif de ces travaux était donc d'évaluer la mobilité du plomb présent dans le profil du sol vers deux types de plantes, en utilisant un dispositif de microculture (mis en place au sein de l'UMR rhizosphère et symbiose de l'INRA de Montpellier (Niebes et al, 1993 ; Guivarch et al, 1999 ; Chaignon et Hinsinger, 2003). Ce dispositif est fondé sur l'obtention d'un tapis racinaire qui est séparé physiquement des racines par une toile en nylon très fine. Ce tapis racinaire est ensuite placé au contact d'une fine couche de

sol, la toile de nylon empêchant la pénétration des racines dans le sol et évitant les problèmes liés à l'adhérence de particules de sol aux racines. Ainsi, les manipulations au niveau des racines sont facilitées, ainsi que l'étude de la fine couche de sol que l'on considère comme étant du sol rhizosphérique. Ce dispositif permet donc d'évaluer les changements dans la spéciation des métaux induits par les racines au niveau de la rhizosphère en plus de l'étude des transferts du plomb du sol vers les plantes.

Le risque sanitaire lié à la consommation de plantes potagères cultivées dans des sols proches d'installations industrielles est une préoccupation actuelle. Nous avons donc choisi d'étudier 2 plantes potagères : la tomate et la fève. Ces plantes ont été cultivées sur différents horizons de sol afin de prendre en compte l'effet « nature du sol » sur le transfert. De plus, nous souhaitons suivre les variations de spéciation du plomb depuis les formes initiales (sol avant la culture) vers les formes présentes dans le sol rhizosphérique, sous l'influence de la plante. La compréhension des mécanismes mis en jeu par les plantes pour modifier la spéciation (forme chimique), l'absorption, la translocation et le stockage éventuel du plomb a ainsi été recherchée.

➤ Enfin, les derniers objectifs de ces travaux de thèse étaient de déterminer l'impact du plomb sur les plantes. La comparaison de nos résultats avec d'autres travaux, soit cités dans la littérature soit obtenus au laboratoire (Thèse de Marcato (2007) et thèse en cours de Pourrut) a montré que le mode de culture pouvait avoir une influence sur les effets provoqués par le plomb absorbé. Nous avons donc approfondi cette comparaison en confrontant les résultats de transfert obtenus lors d'expériences de culture en sol et de culture en hydroponie (par contact avec des lixiviats de sol obtenus selon la méthode normalisée par l'AFNOR NF EN 12457-2 (AFNOR, 2002)). La recherche de tests simples pour estimer la biodisponibilité et la toxicité des métaux est indispensable, cependant il est important d'évaluer les différences éventuelles provoquées par le mode de culture. Pour atteindre cet objectif, la toxicité du plomb a été évaluée grâce au test des micronoyaux. Ces expériences ont été complétées par un suivi du transfert du plomb dans les différents organes et dans la sève des plantes, ainsi que par des observations des racines en microscopie.

PARTIE I : Revue Bibliographique

1 Propriétés physico-chimiques du plomb

Le plomb, du latin *plombum* est un métal mou, gris, habituellement trouvé en petite quantité dans la croûte terrestre. Il n'a ni goût ni odeur caractéristique. Il appartient au group IV b de la classification périodique des éléments. Ses principales propriétés physico-chimiques sont présentées dans le Tableau 1. De configuration électronique $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$, il possède 2 électrons non appariés sur la dernière couche. Cette configuration électronique autorise les degrés d'oxydation (+2) et (+4), en plus de la forme métal (0).

Le cation Pb^{2+} est un acide au sens de Lewis, c'est-à-dire qu'il est susceptible d'accepter un doublet d'électrons venant d'une base, pour former une liaison covalente. Mais c'est également une espèce chargée susceptible d'interactions électrostatiques avec des ions de signes contraires, pour former une liaison ionique (Sposito, 1989).

Le type de liaison est important car il permet de juger de la stabilité du complexe : une liaison covalente lie plus fortement les atomes entre eux qu'une liaison ionique. Pour connaître le type de liaison responsable de la cohésion d'un complexe, le concept de dureté ou de mollesse des acides de Lewis a été développé (Pearson, 1963). Un acide de Lewis est d'autant plus mou qu'il est capable de déformer un nuage électronique. Cette déformation facilite la mise en commun du doublet électronique lors de la création d'une liaison : plus un ion est mou, plus il est apte à former une liaison de type covalent. Le rapprochement des noyaux sera plus important si les 2 éléments ont des nuages électroniques déformables. Par conséquent, les acides mous auront plus d'affinité pour les bases molles (association mou-mou). Si le nuage électronique de l'acide n'est pas déformable, la mise en commun des électrons est difficile. L'acide est dit dur. Les acides durs et les bases dures formeront une liaison à caractère ionique marqué (association dur-dur).

Symbole	Pb
Numéro Atomique	82
Masse atomique	207,2 g.mol ⁻¹
Point de fusion	327°C
Point d'ébullition	1740°C
Densité	11,35
Configuration électronique	$[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$
Valence	0, +2, +4
Rayons ioniques	
Pb^{2+}	0,94 à 1,49 Å
Pb^{4+}	0,78 à 0,94 Å

Tableau 1 : Principales propriétés physico-chimiques du plomb

Dans le milieu naturel, le plomb peut être rencontré sous la forme de 4 isotopes stables : ^{204}Pb , ^{206}Pb , ^{207}Pb et ^{208}Pb dont les pourcentages d'abondance sont respectivement 1,48%, 23,6%, 22,6%, 52,3%. ^{204}Pb est la forme non radiogénique et les 3 autres espèces font partie des formes finales et stables du schéma de désintégration de l'uranium et du thorium. Il possède aussi deux

isotopes radiogéniques, ^{210}Pb ($t_{1/2}=22$ ans) et ^{212}Pb ($t_{1/2}=10$ ans). Ils sont utilisés comme outil de datation mais également comme marqueurs d'origine du plomb (nature de la source) et traceurs de phénomènes environnementaux (transferts abiotiques et biotiques). La signature isotopique est utilisée dans les matériaux environnementaux (sol, sédiment et plantes) pour différencier le plomb d'origine naturelle et celui issu de pollutions anthropiques. On peut par exemple différencier les pollutions au plomb liées à l'utilisation de l'essence ou à l'utilisation d'arséniate de plomb dans le domaine de l'agriculture (BRGM, 2004). Une étude de Hernandez et al (2003) sur différents types de sols français a permis de distinguer, dans les horizons de surface, des enrichissements issus de particules atmosphériques urbaines et des enrichissements directement liés à une contamination par l'essence. Les applications de la mesure des rapports isotopiques du plomb sont nombreuses : (a) caractérisation des différentes sources de pollution au plomb d'un sol, d'une eau ou de l'air ; (b) quantification de la contribution relative des différentes sources de pollution identifiées ; (c) suivi de l'impact de pollution des villes sur leur environnement proche et lointain.

2 Origines dans l'environnement et utilisations du plomb

2.1 Plomb naturellement présent dans l'environnement (fond géochimique)

Le plomb est naturellement présent en moyenne à 0,002% dans la croûte terrestre (36^e élément de la croûte terrestre), généralement sous forme peu soluble. Des dérivés inorganiques sont présents dans les eaux, les sédiments, les sols, l'atmosphère et éventuellement en micro-traces chez les organismes vivants. Les sols non contaminés contiendraient de 10 à 30 mg.kg⁻¹ (Nriagu, 1978 ; Baize, 2002). On trouve en premier lieu le plomb : (i) dans les nombreux gisements dont les principaux se trouvent au Mexique, en Australie et en ex-URSS. En France, on en trouve dans le massif central, en Bretagne et dans les Pyrénées ; et (ii) les 150 mines réparties dans 35 pays. Les réserves étaient de 130 millions de tonnes en 1990 (BRGM, 2004). En raison de son rayon ionique, le plomb peut se substituer à de nombreux éléments (potassium, sodium, calcium, strontium ou barium) et rentre dans la composition de 240 minéraux naturels identifiés (Fleischer, 1966). Les principaux minéraux porteurs de plomb sont présentés dans le Tableau 2 ci-dessous. Ce sont les sulfates, les carbonates, les oxydes et hydroxydes, les sulfures ou les phosphates. Pour des conditions physico-chimiques fixées, la solubilité du plomb dépendra fortement de la nature du composé dans lequel le plomb est engagé.

Nom	Formule
Plomb	Pb
Galène	PbS
Anglésite	PbSO ₄
Boulangérite	Pb ₅ Sb ₄ S ₁₁
Franckéite	Pb ₅ Sn ₃ Sb ₂ S ₁₄
Cerussite	PbCO ₃
Hydrocerussite	(PbO) ₃ , (CO ₂) ₂ , H ₂ O
Phosgénite	PbCO ₃ , PbC ₁₂
Crocoïte	PbCrO ₄
Massicot	PbO
Minium	Pb ₃ O ₄
Dioxyde de plomb	PbO ₂
Hydroxyde de plomb	Pb(OH) ₂
Chlorure de plomb	PbCl ₂
Bromure de plomb	PbBr ₂
Pyromorphite	Pb ₅ (PO ₄) ₃ Cl
Hydroxypyromorphite	Pb ₅ (PO ₄) ₃ OH
Fluoropyromorphite	Pb ₅ (PO ₄) ₃ F
Arséniate de plomb	Pb ₃ (AsO ₄) ₂
Plumbogummite	PbAl ₃ (PO ₄) ₂ (OH) ₅ , H ₂ O
Raspite	PbWO ₄
Wulfénite	PbMoO ₄
Vanadinite	Pb ₅ (VO ₄) ₃ Cl

Tableau 2 : Principaux minéraux et composés de plomb (BRGM, 2004)

2.2 Sources anthropiques

2.2.1 Histoire de l'utilisation du plomb

Le plomb est un métal connu depuis plus de 5000 ans. En effet, par exemple en Egypte des composés de plomb étaient déjà utilisés lors de l'émaillage du travail de poterie, autour de 3000 ans av. JC. La métallurgie du plomb a donc démarré à cette époque. Sous l'empire romain, le plomb était utilisé pour la fabrication de canalisations, la production de monnaie ou bien de la vaisselle, l'oxyde de plomb étant employé comme pigment. Ensuite son utilisation a été largement répandue aux XIX^{ème} et XX^{ème} siècles, sa production atteignant 1 Mt.an⁻¹ à l'ère industrielle (BRGM, 2004). Pendant la première moitié du XX^{ème} siècle, le plomb a été utilisé dans l'industrie, l'imprimerie et les peintures ; dans la seconde moitié du siècle, l'utilisation dominante était liée aux carburants automobiles, le plomb étant ajouté dans l'essence comme antidétonant.

Cependant, depuis les années 1970, le développement de nouvelles technologies ainsi que la prise en compte des problèmes environnementaux et de santé publique ont conduit à la diminution ou à l'arrêt de certaines utilisations du plomb (canalisations, soudure, peinture, pesticides, anti-détonnant dans l'essence...). Actuellement, la consommation de plomb continue de diminuer, sa principale utilisation étant dans les piles et batteries. Par contre, la production secondaire (à partir de la valorisation des déchets) progresse par rapport à la production primaire (à partir de minerais). La France produit 300 000 tonnes de Pb par an dont 40% sont du métal recyclé. En 2004, les batteries au plomb, destinées à l'automobile ou à l'industrie, représentent 72 % de la consommation de plomb (53 % automobile, 19 % industrie). Les pigments et autres composés chimiques représentent 12 % de la consommation. Les autres applications (alliages pour soudures, tuyaux et feuilles, munitions, ...) représentent 16 %.

2.2.2 Différentes utilisations du plomb

La présence généralisée du plomb dans l'environnement est essentiellement due aux activités humaines. Cette origine anthropique est multiple car les utilisations passées ou présentes du plomb sont très nombreuses.

- Activités métallurgiques : Elles comprennent la métallurgie de première fusion lors de laquelle le minerai de plomb subit différents traitements afin d'extraire le plomb et les autres métaux. Il existe aussi la métallurgie de 2^{ème} fusion ou recyclage, qui consiste à obtenir du métal par la récupération de déchets contenant du plomb.
- Production d'essence au plomb. Le tétraéthyle de plomb ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$) était le principal constituant des agents antidétonants ajoutés à l'essence, pour augmenter le taux d'octanes. Cette utilisation est interdite depuis le 1^{er} janvier 1996. Avant son interdiction, le plomb utilisé dans l'essence représentait la majeure partie du plomb disséminé, à cause des émissions de fumées.
- Protection contre les radiations. Du fait de sa densité importante, le plomb est utilisé pour la protection contre le rayonnement γ .

➤ Accumulateurs. Les batteries au plomb sont constituées de 2 électrodes, une positive ($\text{PbO}_2/\text{PbSO}_4$) et une négative (Pb/PbSO_4) immergées dans une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4). **Une batterie contient environ 8,6 kg de plomb.** Les batteries restent la principale utilisation du plomb actuellement.

➤ Munitions (cartouches et grenailles de plomb) et lest de pêche. Des études (Baron, 2001) ont montré que cette utilisation était responsable du saturnisme des oiseaux. De plus, cela entraîne la dispersion d'environ 8000 t.an^{-1} , dont les $\frac{3}{4}$ sont dus à la chasse (BRGM, 2004).

➤ Peintures, pigments, apprêts. La cérusite ou blanc de plomb ont été utilisés dans les peintures pendant près de 2000 ans. Le plomb a également été utilisé comme composante de nombreux pigments en peinture. Le minium Pb_3O_4 est appliqué sous forme d'une couche anti-rouille sur de l'acier (interdit désormais comme peinture pour la coque des navires : submarine). Le stéarate de plomb ($\text{Pb}(\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COO})_2$) et l'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO-O})_2$) sont ajoutés à la peinture ou aux vernis comme dessiccateurs. L'utilisation dans les peintures est arrêtée depuis 2002.

➤ Verre et cristal. Le plomb est utilisé pour abaisser la température de fusion et pour assurer une meilleure transparence.

Une fois que le plomb est relâché dans l'atmosphère, il peut traverser des milliers de kilomètres, surtout si les particules sont submicroniques ou s'il est sous forme de composés organiques volatils.

Le plomb trouvé dans les sols urbains vient des habitats anciens (peintures, chauffage au fuel...) ainsi que des émissions de fumées automobiles. Celui trouvé dans les sols ruraux vient plutôt des activités industrielles (production de batteries,...), des munitions pour la chasse, des manufactures et des mines. Il faut aussi considérer le plomb qui vient de l'atmosphère et qui se dépose, le lessivage des peintures, ainsi que les pluies acides, le fonctionnement des décharges et des stations d'épurations.

De fortes concentrations en plomb sont mesurées à proximité des routes. Elles proviennent d'abord des anciennes émissions de gaz d'échappement des automobiles. Le plomb s'est alors solidement fixé aux particules de sol. Une petite partie de ce plomb peut être entraîné dans les rivières et les lacs, lors du processus d'érosion qui arrachent les particules de sol liées au plomb et les entraînent par ruissellement vers les hydrosystèmes de surface. Le mouvement du plomb associé aux particules du sol dépend du type de plomb (sels ou composés) et des caractères physico-chimiques du sol. Le niveau de plomb peut augmenter dans les plantes, les animaux, l'air, l'eau ou les sols. En effet, la consommation de produits contaminés entraîne le passage de plomb dans les organismes.

2.2.3 Quelques données économiques

Pb	1975	1980	1985	1990	1999	2003
	3432	3448	3431	3367	3010	2850

Tableau 3 : Evolution de la production primaire de plomb de 1975 à 2003, en kt par an.

Depuis les années 80, la production primaire de plomb diminue (Tableau 3), et en même temps, le plomb des batteries usagées est de plus en plus recyclé. En 2000, alors que la production mondiale totale de plomb raffiné s'élevait à 6,57 millions de tonnes seulement 2,96 étaient extraits des mines. Plus de la moitié provient donc du recyclage de ce métal de récupération contenu dans les batteries ou les autres matériaux.

Prix du plomb : Le plomb est un métal dont le prix de vente est très cyclique ; il est coté en dollars US, en particulier à la Bourse des Métaux de Londres. Sur les dix dernières années, les cours ont évolué entre 400 \$ par tonne et 2 720 \$ par tonne. Ce cours conditionne en grande partie le dynamisme des activités de recyclage.

2.2.4 Cycle biogéochimique

Le plomb contenu dans les roches peut se retrouver dans les sols, par altération de ces dernières, à des teneurs variables selon la composition initiale de la roche mère. De même, il est présent dans tous les autres compartiments de l'environnement (eaux, air et même les êtres vivants).

La localisation ou la forme chimique du plomb dans l'environnement peut varier selon des phénomènes naturels ou par l'intervention de l'homme.

Il existe donc un véritable cycle biogéochimique du plomb (tout comme il existe un cycle pour les éléments majeurs et les autres éléments traces) qui peut être schématisé comme sur la Figure 1 et au cours duquel le plomb change de compartiment et de forme chimique sous l'influence de processus naturels ou anthropiques.

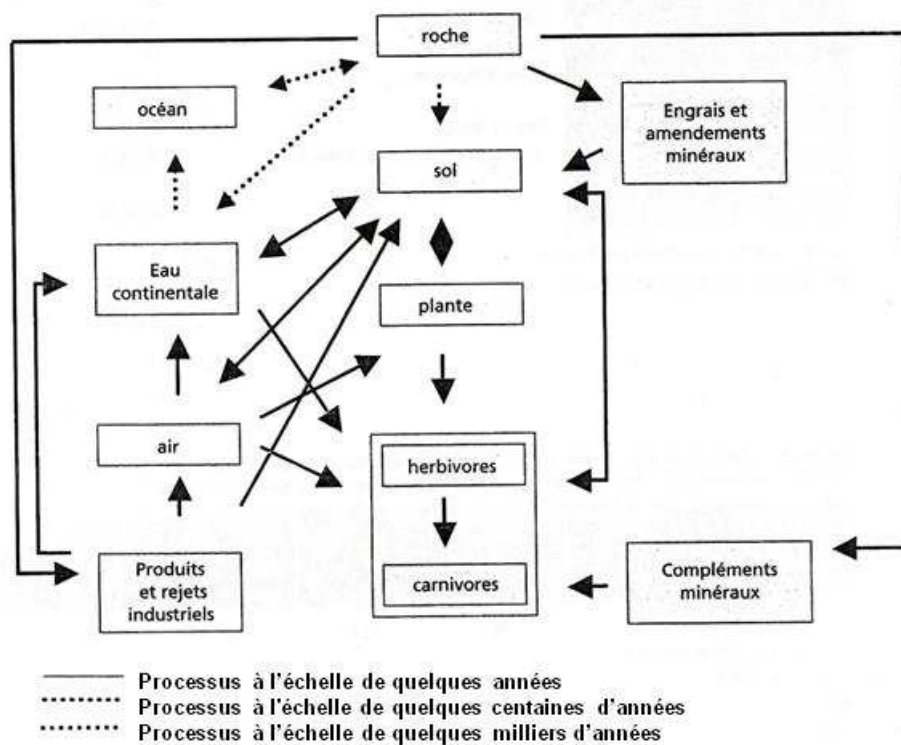


Figure 1 : Cycle biogéochimique des éléments (adapté de Lamand et al, 1991)

3 Toxicité du plomb pour l'homme

De nombreuses utilisations historiques du plomb ou de ses composés sont désormais proscrites en raison de la toxicité du plomb. Mais il reste largement présent dans les sols, les logements anciens et insalubres ainsi que dans certains produits domestiques (peintures, vernis, canalisations...).

3.1 Voies d'exposition

Les différentes voies de pénétration du plomb sont résumées dans le Tableau 4. Chez l'adulte, la voie de pénétration majoritaire est l'inhalation de particules, alors que chez l'enfant, c'est plutôt l'ingestion par voie orale. La consommation d'eau passant par des canalisations en plomb peut également être responsable de l'ingestion de plomb. Plus rarement, le plomb peut pénétrer par voie cutanée, notamment par contact avec des crèmes contenant du plomb. Enfin, il ne faut pas négliger la consommation de gibiers tués par des balles en plomb, qui représente une source non négligeable de contamination au plomb.

Alimentation	Ingestion	Plantes contaminées par des retombées atmosphériques et/ou accumulation depuis le sol
		Gibier Stockage des aliments
Poussières	Inhalation	Poussières fines Fumées de cigarettes Emissions automobiles
		Ecailles de peintures anciennes Poussières de peinture lors des travaux de rénovation Ingestion de sol par les jeunes enfants (pica)
Peintures	Ingestion Inhalation	Métallurgie du plomb Fabrication d'accumulateurs et de batteries Récupération des métaux Soudure
		Décapage des vieilles peintures Manipulation de pigments Poussières Activité de poteries, imprimerie artisanale...
Activité professionnelle/ Loisirs	inhalation	

Tableau 4 : Voie d'exposition au plomb chez l'homme (d'après BRGM, 2004)

3.2 Valeurs limites réglementaires

La contamination des écosystèmes par le plomb peut être à l'origine d'une exposition humaine. Il est donc important d'établir des seuils de qualité, notamment pour l'eau, l'air ambiant extérieur mais aussi dans les denrées alimentaires. Différents textes de loi, au niveau national, mais aussi européen fixent ces valeurs limites.

PARTIE I : Revue Bibliographique

Les teneurs limite permises dans les eaux de consommation et dans l'air sont présentées dans le Tableau 5. Le Tableau 6, quant à lui, présente les valeurs limite réglementaires dans les denrées alimentaires (en vigueur au 1^{er} janvier 2006).

milieu	Texte de loi	Teneur en plomb
Eaux de consommation		
France	Décret n°2001-1220 (20 décembre 2001), puis décrets 2003-461 et 2003-462 (21 mai 2003)	10 µg.L ⁻¹ ^a
UE	Directive 98/83/CE (3 novembre 1998)	10 µg.L ⁻¹
OMS	Directive de qualité pour l'eau de boisson (1996)	10 µg.L ⁻¹
Air		
France	Décret n°2002-1085 (19 novembre 2002)	0,5 µg.m ⁻³ ^b
UE	Directive 2004/107/CE (15 décembre 2004)	0,5 µg.m ⁻³
OMS	Directive de qualité de l'air (2000)	0,5 µg.m ⁻³

Tableau 5 : Valeur de teneurs limites en plomb dans les eaux de consommation et dans l'air (d'après Pichard, 2002 et adapté par BRGM, 2004)

^a Cette limite était fixée à 50 µg.L⁻¹ jusqu'en 2003. L'article R1321-65 du nouveau code de la santé publique (2003) rend la valeur limite de 10 µg.L⁻¹ obligatoire à partir du 25 décembre 2013.

^b Actuellement cette valeur est fixée à 0,9 µg.m⁻³. La valeur limite de 0,5 µg.m⁻³ établie dans le décret n°2002-1085 sera en vigueur le 01/01/2010.

Produit	Teneur maximale (mg.kg ⁻¹ de poids frais)	Texte source
Lait de vache (lait cru, destiné à la consommation ou à la fabrication de produits à base de lait)	0,02	
Préparations pour nourrissons	0,02	Règlement
Viande bovine, de mouton, de porc, de volaille	0,1	CE/466/2001
Abats comestibles de bovins, de moutons, de porcs, de volailles	0,5	
Chair de poissons	0,2	Règlement
Crustacés	0,5	CE/78/2005
Céréales, légumineuses, légumes à cosse	0,2	
Légumes (sauf légumes-feuilles, brassicées, fines herbes, champignons)	0,1	
légumes-feuilles, brassicées, fines herbes, champignons	0,3	
Fruits (sauf petites baies et petits fruits)	0,1	Règlement
Petites baies et petits fruits	0,2	CE/466/2001
Huiles et matières grasses	0,1	
Jus de fruits	0,05	
Vins	0,2	

Tableau 6 : Valeurs réglementaires en vigueur dans les denrées alimentaires pour le plomb (les teneurs s'appliquant à la partie comestible des denrées alimentaires mentionnées). (INERIS, 2006).

Bien que le sol fasse l'objet d'une réglementation à plusieurs titres (bien, propriétés foncière), la législation européenne n'a pas encore donné de cadre spécifique à la protection des sols. Ainsi, pour définir le cadre législatif de la protection des sols, il convient de se référer aux différents textes organisant la protection de l'environnement, et ce par de multiples approches. La problématique de « pollution des sols » apparaît dans la directive cadre européenne relative à l'utilisation des boues de station d'épuration de 1986 (86/278/CEE). Cette directive fixait une teneur maximale en métaux dans les boues de stations d'épuration destinées à l'épandage sur des sols agricoles. Elle visait à éviter les effets nocifs de ces boues sur les sols, la végétation, les animaux et l'homme, tout en encourageant leur utilisation. Elle fixait aussi des teneurs maximales à ne pas dépasser dans les sols. Concernant le plomb, ces valeurs limites étaient comprises entre 50 et 300 mg Pb/kg de sol sec, pour des sols dont le pH est compris entre 6 et 7. Tous les textes réglementaires sortis depuis reprennent les seuils indiqués dans cette directive (Gavalda et al., 2005).

La protection des sols est également abordée dans les textes relatifs à la qualité des eaux de consommation ou des eaux souterraines, ainsi que dans ceux relatifs à la mise en décharge des déchets (1999/31/CE) ou la pollution atmosphérique (1999/13/CE). En France, la protection des sols ne profite pas non plus d'un cadre juridique spécifique. Il faut donc également se référer à diverses réglementations (installations classées pour la protection de l'environnement, réglementations spécifiques sur l'eau, l'air, les déchets, les matières fertilisantes et les produits phytosanitaires).

Certaines raisons peuvent être avancées pour cette absence de réglementation spécifique en matière de teneurs en plomb dans les sols:

- la forte variabilité des concentrations de métaux dues au fond géochimique. Des anomalies géochimiques positives peuvent engendrer des concentrations élevées dans des sols non pollués.
- la variabilité de la toxicité en fonction de la spéciation chimique et de la compartimentation.

Les réflexions actuelles sur la gestion des sols pollués par les métaux sont d'avantages orientées vers une détermination précise des risques sanitaires basée sur la réalisation de scénarios d'exposition.

Actuellement, un projet de directive cadre européenne sur la protection des sols a été proposé en 2006 et adopté en première lecture le 14 novembre 2007. Ce projet modifie la directive de 2004, relative à la responsabilité civile environnementale (concernant la prévention et la réparation des dommages environnementaux). Ce nouveau projet de directive vise à améliorer la qualité de l'environnement et à renforcer les moyens de lutte contre la régression et la dégradation des sols. Les états devront répertorier leurs sites pollués (installations pouvant causer des accidents industriels, les installations minières, les décharges, les sites ayant hébergé des activités affectant les sols), et également lister des zones prioritaires de protection, pour protéger les sols de l'érosion, de la désertification, des effets néfastes du changement climatique, l'appauvrissement de la biodiversité du sol... Enfin, les états devront élaborer des stratégies d'assainissement des sols pollués. Les mesures mises en œuvre étant laissées au libre choix de chaque état.

Le manque de législation propre au sol a entraîné la création par l'INRA d'Orléans du programme ASPITET (Apport d'une Stratification Pédologique à l'Interprétation des Teneurs en Eléments Traces) en 1993. Son but était de constituer un premier référentiel national pour comprendre la répartition tridimensionnelle des éléments traces dans le sol. Pour cela, il fallait acquérir des références sur les teneurs en éléments traces dans divers sols français, puis comprendre les relations entre ces teneurs et des données pédologiques et géologiques. Enfin l'objectif final était de proposer des démarches d'interprétation applicables partout. Ce programme, depuis sa création a permis d'étudier de très nombreux sols français (agricoles ou forestiers), en analysant les caractéristiques pédologiques ainsi que les teneurs en éléments traces. Il est prolongé actuellement dans un programme national et européen au sein d'un réseau de mesure de la qualité des sols (RMQS).

Ce réseau permettra de disposer d'un bilan national de l'état et de l'évolution des sols, et de détecter de façon précoce les dégradations irréversibles, afin de préserver le patrimoine sol, sa valeur économique et indirectement, de contribuer à protéger la santé humaine, favoriser le développement économique et maintenir la qualité de l'environnement (Saby and Arrouays, 2005 ; Canut et al., 2007). Intégré à un maillage qui se prolonge dans les autres pays européens, ce programme a, en réalité une échelle européenne à travers le programme ENVASSO (**E**nvironmental **A**ssessment of **S**oil for **M**onitoring).

Toujours dans le cadre de diagnostics environnementaux et d'évaluation des risques sanitaires, liés aux sites et sols pollués, un groupe de travail a créé une base de données sur les teneurs en éléments traces dans les plantes potagères (projet BAPPET, 2005-2007). Ce groupe de travail était composé par des chercheurs de l'ENSAT, de l'ADEME, de l'ISA de Lille, de l'INERIS et du CNAM. Ce programme avait pour but de mettre à disposition des données de transfert sol-plante potagères des ETM (mesures sur sites, données de modélisation et bibliographie) dans un contexte détaillé (type de sol, type de contamination, etc.). L'objectif étant de développer un outil d'aide à l'évaluation des expositions de l'homme aux polluants par la consommation de plantes potagères.

3.3 Effets toxiques chez l'homme

Le plomb se diffuse rapidement vers les différents organes comme le cerveau, les dents, les os, par la circulation sanguine. La demi-vie du plomb dans les tissus mous et dans le sang est de 30 jours environ, mais elle passe de 1 à 10 ans dans les os (Pichard, 2002).

En général, le plomb dans le corps humain se répartit comme suit :

- ✓ 1 à 2 % dans le sang
- ✓ 5 à 10 % dans les tissus mous (rein, foie, rate)
- ✓ **Plus de 90 % est fixé sur les os**

L'élimination du plomb se fait majoritairement par les urines, puis par les fèces, la salive et la sueur, et enfin par les ongles et les cheveux.

Le plomb a de nombreux effets toxiques sur la santé, qui sont basés sur les niveaux de plomb dans le sang ou plombémie sanguine. En effet, il est responsable du saturnisme en cas d'exposition chronique. Il peut provoquer une grande fatigue, des troubles du comportement, de la mémoire, du sommeil, des systèmes immunitaires et reproducteurs, mais ses principaux organes cibles sont le système nerveux, les reins et le sang. En bloquant plusieurs enzymes nécessaires à la synthèse de l'hémoglobine, il entraîne une diminution du nombre de globules rouges et une anémie. De plus, le plomb passe facilement la barrière placentaire par diffusion, d'où un risque d'exposition prénatale.

4 Le plomb dans le sol

4.1 Généralités et concepts de base

Issu d'un processus d'altération, le sol est un milieu poreux, crée par des processus physiques, chimiques et biochimiques qui transforment des matériaux géologiques sous l'action combinée des êtres vivants et des solutions de percolation. Il est formé de minéraux primaires, hérités de la roche mère auxquels s'ajoutent des minéraux secondaires, issus de la transformation chimique des précédents. Les constituants organiques interfèrent fortement avec les constituants minéraux.

Le plomb est un élément minéral naturellement présent dans la croûte terrestre, en général à de faibles teneurs, son origine dans les sols étant liée à sa présence dans la roche mère. Ceci peut cependant conduire parfois à des teneurs sensiblement plus élevées dans certains gisements. Mais, ce sont surtout les dépôts continus de métaux et métalloïdes par les activités humaines qui ont conduit à leur accumulation dans les différents compartiments de l'environnement. Ceci surtout au voisinage des centres urbains et industriels, mais également dans des zones plus reculées.

Le comportement du plomb dans un sol dépend de différents facteurs comme sa dynamique propre mais également des caractéristiques pédologiques et physico-chimiques du sol (Baize, 1997). Il peut être soit sous forme liée aux particules de terre soit dans la phase aqueuse. Dans les sols contaminés, la forme chimique initiale et la teneur en polluant apportée ont également une influence. En effet, de nombreux travaux ont montré que la spéciation avait une influence sur le devenir des ETM dans l'environnement (Hinsinger, 1996, Dumat et al., 2001 ; Ferrand et al., 2006). Il est donc fondamental de déterminer la génèse, la répartition, la localisation la configuration des associations du plomb avec les différents constituants du sol.

4.2 Associations avec les différents constituants du sol

Les interactions entre le métal et le sol dépendent des caractéristiques physico-chimiques du sol (pH, Eh, nature et proportions des argiles, matières organiques et oxydes, etc.), de son fonctionnement actuel, de la dynamique propre de l'élément et de la spéciation initiale du polluant (intérêt de caractériser les sources).

Les interactions entre les différents constituants des sols (argiles, matières organiques et oxydes) modifient aussi la capacité individuelle de chacun des constituants à adsorber ou complexer les métaux.

4.2.1 Interactions avec les oxydes de fer et de manganèse

Les oxydes et les hydroxydes présents en abondance sous forme amorphe ou cristalline dans la majorité des sols jouent un rôle prépondérant dans la sorption des ions métalliques de par leur faible solubilité dans les conditions ordinaires de pH (Morin et al, 1999; O'Reilly et al, 2002).

Les oxy et hydroxydes de fer (goethite, lépidocrocite, magnétite, ferrihydrite, formes amorphes) et de manganèse des sols montrent une affinité particulière pour les éléments traces. Ils jouent

un rôle d'échangeurs de cations. Des phénomènes d'échange et d'adsorption spécifique peuvent conduire à des accumulations de quantité relativement fortes d'éléments traces.

Dès 1995, Sparks (1995) établit une échelle de sélectivité des cations métalliques divalents pour différentes formes de fer. Le plomb se trouve parmi les éléments qui ont la plus forte affinité pour les formes cristallisées de fer aussi bien que pour les formes amorphes.

Deux types de mécanismes sont évoqués pour expliquer l'association du plomb avec le fer. Il peut se substituer au fer dans le réseau cristallin de l'oxyde lors de sa cristallisation (co-précipitation avec les oxydes de fer ou bien être fixé à la surface des cristallites de ces mêmes oxydes (adsorption et précipitation en surface). Une fois adsorbés, certains ions sont également capables de diffuser vers l'intérieur du cristal afin de rejoindre des cavités au sein du réseau cristallin (absorption).

Dans les phénomènes d'adsorption, il convient de distinguer l'adsorption non spécifique de l'adsorption spécifique. L'adsorption non spécifique relève du simple échange ionique : il s'agit d'une réaction rapide, stoechiométrique, le plus souvent réversible et qui met en jeu des forces électrostatiques. Elle est destinée à compenser les déficits de charge induits par les substitutions isomorphiques. La nature des ions adsorbés dépend surtout de leur taille, de leur charge et de leurs concentrations respectives dans la solution du sol. Le complexe ion adsorbé-adsorbant est de type "sphère externe" : une molécule d'eau est présente entre l'adsorbant et l'ion adsorbé. En raison de la nature des forces impliquées, ce type de d'interaction est également désigné par le terme de "physisorption". Dans ce type d'interaction, tous les sites de fixation à la surface du colloïde sont équivalents en terme énergétique : ce mécanisme de fixation est donc un processus peu sélectif. Dans le cas de l'adsorption spécifique, il s'établit une liaison chimique (liaison covalente ou hydrogène) entre le l'adsorbant et le ligand si bien que le ligand peut être un anion, un cation ou une molécule neutre. Ce type d'interaction est aussi appelé "chimisorption" et conduit à la formation de complexe "sphère interne" : le ligand et l'adsorbant sont en contact direct, sans molécule d'eau interposée. L'efficacité des oxydes de fer dans le piégeage des éléments traces est telle que certains auteurs envisagent de les utiliser pour réduire la biodisponibilité des métaux lourds dans les sols pollués (Gavalda, 2001).

La plupart des processus de pédogénèse qui conduisent à une répartition du fer le long du *solum*, répartissent aussi le plomb en même temps. Ainsi Gavalda (2001) a montré que dans des sols non contaminés de la région Toulousaine, le plomb s'accumulait systématiquement dans les zones oxydées traduisant une forte affinité de cet élément pour les oxydes de fer. Alors que les teneurs en plomb de l'horizon lessivé sont autour de 20 mg kg^{-1} , ces teneurs sont multipliées par 20 dans les zones de concrétionnement ferromanganeuse. L'auteur a montré une corrélation positive entre le fer libre et la teneur en plomb au sein d'un profil, qu'il décrit dans un modèle linéaire simple ($[\text{Pb}] = 3,388 [\text{Fe}_2\text{O}_3] + 9,175$; $r^2 = 0,881$). Depuis, d'autres auteurs ont confirmé ces résultats sur d'autres types de sols non contaminés (Cornu et al., 2005 ; Soubrand-Colin et al., 2007). Enfin, Tume et al (2006) ont montré que les oxydes de fer jouaient un rôle très important dans la rétention des métaux dans des sols non contaminés de Catalogne.

Finalement, tous ces résultats amènent à la conclusion que le devenir des éléments traces est intimement lié à celui des éléments majeurs, la répartition de ces derniers au sein d'un profil pouvant

expliquer celle des métaux traces issus du fond géochimique (Morel 1998). Or, les éléments majeurs sont présents dans le sol dans des proportions de l'ordre de 10^{-2} , alors que le plomb, comme les autres métaux traces l'est dans des proportions 10 000 fois plus faibles. Toute contamination va donc impacter fortement sur ces relations entre éléments majeurs et éléments traces. Il est donc possible d'utiliser ces relations pour discriminer les horizons contaminés et non contaminés, tel que l'avait proposé Gavalda (2001). D'autres chercheurs tels que Hamon et al (2004) ; Ettler et al., 2005 ; Lamy et al (2006) ou Sterckeman et al (2006) utilisent ces relations existant entre les teneurs en plomb et les teneurs en fer pour détecter des anomalies de concentrations en plomb, et pour établir les teneurs attendues dans un sol non contaminé. Cette approche, que nous appellerons « pédologique » a été mise en œuvre dans ces travaux de thèse, et elle est présentée dans la partie III (chapitre I) de ce manuscrit.

4.2.2 Interactions avec les argiles

Les argiles sont des silicates d'aluminium organisés en feuillets formés d'un empilement successifs de couches tétraédriques $(\text{Si}_2\text{O}_5)^{2-}$ et octaédriques $(\text{Al}_2\text{OH}_4)^{2+}$. Des substitutions isomorphiques de Si par Al dans la couche tétraédrique et de Al par Fe et Mg dans la couche octaédrique vont générer des charges négatives sur les feuillets qui sont compensées par des cations majeurs tels que K^+ , Na^+ ou Ca^{2+} mais aussi des éléments traces tels que le Pb^{2+} . Chaque zone de cassure des feuillets est également chargée électriquement, or ces cassures sont nombreuses car les argiles sont des particules de petite taille ($2\mu\text{m}$). Elles possèdent donc une forte réactivité chimique et physique, ainsi qu'une importante surface de contact. Elles peuvent développer de grande surface spécifique, et peuvent fixer les métaux par 3 mécanismes principaux : l'échange ionique, l'adsorption physique et l'adsorption chimique (Alloway, 1995). Bittell et Miller (1974) ont établi un ordre de réactivité pour l'adsorption du plomb sur 3 types de minéraux argileux : kaolinite > illite > montmorillonite. Cependant Li et Li (2000) montrent, qu'un sol riche en illite adsorbe plus de plomb qu'une kaolinite et ils attribuent ce résultat aux différences de charge de surface entre la kaolinite et l'illite. Parmi les minéraux argileux, on compte aussi la vermiculite qui présente une forte affinité pour les réactions d'échange avec le plomb (Rickard et Nriagu, 1978).

4.2.3 Interactions avec les carbonates et les phosphates

Ce type d'associations se produit le plus souvent lorsque les métaux quittent la solution du sol pour précipiter au sein des phases minérales (Dyab, 2005). Les carbonates jouent un rôle important dans les sols. Leurs équilibres de dissolution contrôlent particulièrement le pH. Une teneur élevée en carbonates rend le sol alcalin. La surface des carbonates est le siège de phénomènes de sorption des ions métalliques (Plassard, 1999). Cependant, au-delà de l'adsorption de surface, il peut aussi se produire une incorporation des cations métalliques dans la maille cristalline des carbonates (Bourg et al, 1988).

Des études ont ainsi montré que le plomb était capable de s'adsorber à la surface de la calcite et d'occuper les sites du calcium, malgré les différences de rayons ioniques entre le plomb et le calcium (Quian et al, 1994 ; Sturchio et al, 1997).

D'autres associations sont possibles avec les phosphates. Nriagu (1984) démontre que la chloropyromorphite ($\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$) est un minéral très peu soluble, et qu'elle est capable de fixer le plomb dans les sols. Les travaux de Cotter-Howelles et al (1994) ont permis de l'identifier comme phase dominante dans un sol minier par des méthodes spectroscopiques. Buatier et al (2001) l'ont également identifiée dans des sols contaminés par les retombées atmosphériques d'une usine de métallurgie du nord de la France. D'autres chercheurs (Sarret et al., 2001 ; Dyiab, 2005) sont allés un peu plus loin dans les travaux sur la solubilité des phosphates, en montrant que la formation de ces minéraux diminuerait non seulement la mobilité du métal, mais également sa phytodisponibilité.

4.2.4 Interactions avec les matières organiques du sol (MOS)

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence l'affinité des ETM pour les MOS (Morin et al., 1999 ; Lamy, 2002, Dumat et al., 2006...). Cette affinité se traduit par des réactions d'absorption, qui sont contrôlées par des complexes de sphère interne ou externes ou bien par des mécanismes d'échanges ionique (Evans, 1989 ; Kinniburgh et al, 1996). Les métaux se complexent à des matières organiques de poids moléculaires variables (Stevenson, 1982), par exemple aux substances humiques, qui sont les constituants majeurs de la fraction organique de la plupart des sols. Ces substances possèdent une capacité à fixer des métaux, qui a été mise en évidence dans de nombreux travaux (Hatira et al, 1990 ; Tipping et al, 1995). Les interactions entre cations métalliques et substances humiques font intervenir des groupements fonctionnels : $-\text{COOH}$ (carboxyles), $-\text{NH}_2$ (amines), $>\text{C}=\text{O}$ (carbonyles), $>\text{N}-\text{H}$ (imines) et $-\text{S}-\text{H}$ (thiols) (Alloway, 1995). La lignine est un composé parmi les plus persistants dans le sol, qui possède également une capacité de fixation des métaux. Enfin, d'autres matières organiques peuvent fixer des métaux, telles que des acides organiques de faible poids moléculaire (acide acétique, oxalique..), des sucres (formation de complexes entre les métaux et les groupements hydroxyles des monosaccharides) ou des protéines.

Des corrélations entre le taux de MOS et leur effet sur l'adsorption du plomb ont été établies dans le cadre de plusieurs travaux (Zimdahl et Hassett, 1977 ; Gerritse et al, 1982). Ils ont montré que les concentrations en plomb trouvées dans les sols étaient étroitement corrélées à la teneur en MOS, l'adsorption du plomb augmentant avec la teneur en MO. Les travaux de Morin et al (1999) et Dumat et al. (2001) sur des sols pollués du nord de la France ont montré une forte association entre le plomb et la matière organique dans la fraction $<2\mu\text{m}$.

4.3 Spéciation en phase aqueuse

Les métaux sont libres (Pb^{2+}) ou complexés à des ligands inorganiques (hydroxydes ou chlorure) ou à des molécules organiques dans la phase liquide du sol (Sposito et al, 1983). Comme pour l'ensemble des éléments chimiques, sa spéciation en phase aqueuse est fortement contrôlée par le pH et le potentiel redox (Figure 2), ainsi que par le type et la concentration en agents complexant présents dans la solution.

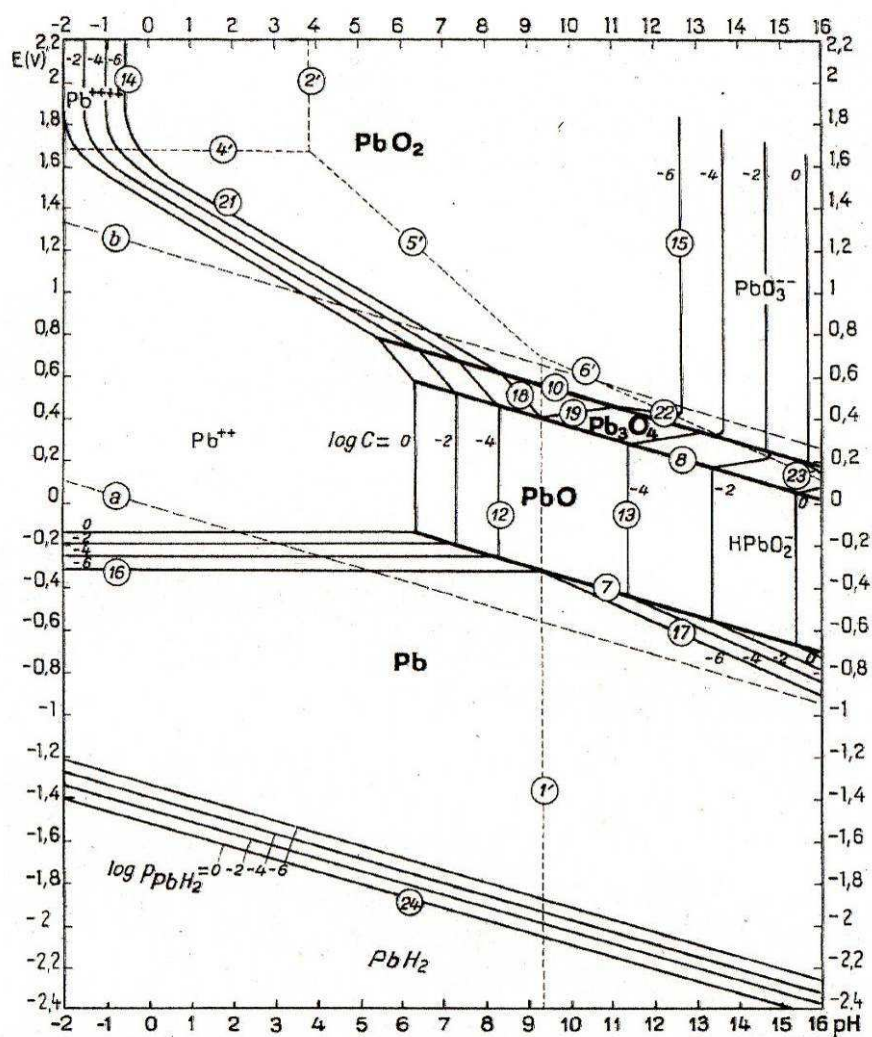


Figure 2 : Diagramme pH/Eh du système plomb-eau à 25°C (d'après BRGM, 2004)

4.3.1 Complexes inorganiques

Le plomb peut former des espèces aqueuses hydroxylées : PbOH^+ ; $\text{Pb(OH)}_{2\text{aq}}$ et Pb(OH)_3^- (Baes et Mesmer, 1976). Il peut aussi former des complexes aqueux avec des ligands de type carbonates, chlorures, sulfates, nitrates et fluorures, même si PbNO_3^+ , PbCl^+ , PbCl_2 et PbCl_3^- sont très peu stables en solution. Des calculs de spéciation dans des eaux de rivières (Nriagu et al, 1978 ; Hem, 1985) montrent que des complexes carbonatés apparaissent prédominants pour des valeurs de $\text{pH} > 6,5$ et que pour des valeurs de $\text{pH} < 6$ l'espèce Pb^{2+} devient dominante (Figure 3).

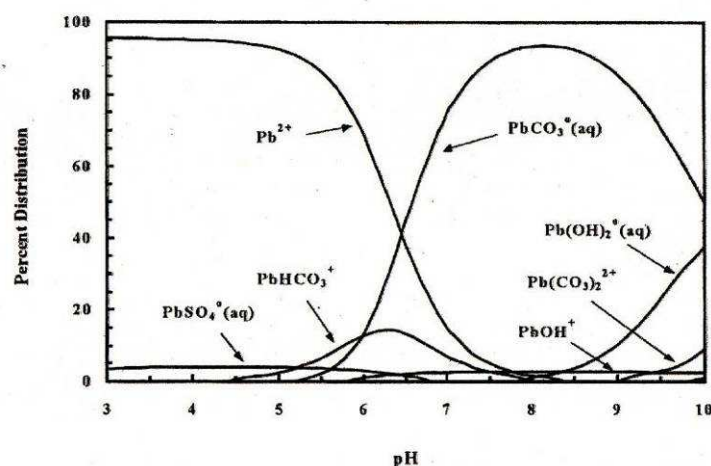


Figure 3: Distribution des espèces aqueuses du plomb en fonction du pH (d'après BRGM, 2004)

4.3.2 Complexes organiques

Dans certains sols, la formation d'espèces méthylées d'origine microbienne a déjà été évoquée (Rickard et Nriagu, 1978). Ces espèces sont beaucoup moins présentes que les complexes inorganiques, mais elles sont beaucoup plus toxiques. Il existe aussi des alkyls de plomb (qui étaient présents dans les essences) qui présentent une très forte toxicité, et qui s'accumulent dans des organismes marins (Mikac et al., 2001).

Déterminer la spéciation des métaux dans la solution implique d'extraire la solution du sol, grâce à des dispositifs expérimentaux comme des lysimètres, des bougies poreuses ou bien grâce à des centrifugations du sol. Cependant, ils introduisent des artéfacts dans la composition chimique de la solution extraite (Liator, 1988), ce qui peut altérer la spéciation du métal identifié. Une fois extraite, la solution peut être analysée par des techniques spectrométriques (ICP-AES ou ICP-MS selon la gamme de concentration considérée). L'estimation de la fraction labile du plomb peut être réalisée grâce à l'utilisation des DGT (diffusion gradient in thin film).

4.4 Mobilité du plomb

La mobilité d'un élément dans le sol est son aptitude à passer d'un compartiment où il est retenu à un compartiment où il est retenu avec une énergie moindre, le compartiment ultime étant la phase liquide ou éventuellement l'atmosphère du sol (Juste, 1988). La mobilité du plomb est principalement contrôlée par sa spéciation en phase aqueuse et par des processus d'adsorption/désorption ainsi que de dissolution/précipitation. Le rôle de certains paramètres tels que le pH, le potentiel redox, la composition minéralogique du sol ou du sédiment et la présence de ligands ou de colloïdes dans la phase va être déterminant. Le plomb étant en général considéré comme un élément peu mobile dans les milieux naturels, il a donc tendance à s'accumuler dans les horizons superficiels des sols. Les travaux de Sterckeman (2000) par exemple, démontrent que dans des profils de sol au voisinage de 2 fonderies du Nord-pas de Calais, le plomb est essentiellement concentré dans les 30 premiers centimètres.

4.4.1 Influence des paramètres physico-chimiques sur la spéciation du plomb

4.4.1.1 Influence du pH

C'est le facteur qui influence le plus la mobilité et la biodisponibilité du plomb (Swaine, 1986). Les risques de mobilité sont plus grands dans les milieux acides, alors que la solubilité diminue avec l'élévation du pH. A pH 5, le plomb semble majoritairement adsorbé aux oxydes et aux matières organiques (Alloway, 1995), et une augmentation du pH a pour effet de rendre le plomb moins biodisponible. Zhang (1998) remarque que le plomb est déplacé de la fraction sulfate $PbSO_4$ vers la pyromorphite sous l'effet du pH et en présence d'apatite. Martinez et Motto (2000) ont montré, dans différents types de sol, que la concentration des métaux dans la phase aqueuse augmentait quand le pH diminuait. Les travaux de Shu et al (2001) ont mis en évidence un appauvrissement en Pb, Zn, Cu et Cd dans des horizons superficiels acides de sols miniers. Cet appauvrissement serait causé par une augmentation de la mobilité des métaux due à une acidification des résidus miniers. Enfin, on peut mentionner le chaulage des boues utilisées en agriculture. Il entraîne une augmentation de pH qui permet de réduire considérablement la mobilité et la biodisponibilité des métaux contenus dans les boues (Doucet et al, 1999).

4.4.1.2 Influence du potentiel redox

Le potentiel d'oxydoréduction (Eh) exprime le flux d'électrons des agents réducteurs vers les agents oxydants. Il est contrôlé par l'activité des électrons en solution (Sposito, 1983).

Bien que le plomb garde globalement le même état d'oxydation dans les milieux naturels, sa mobilité va néanmoins être affectée par des variations de potentiels redox du milieu. Ces variations sont susceptibles de modifier la chimie de la phase aqueuse, pouvant entraîner des phénomènes de précipitation de minéraux contenant du plomb. A l'inverse, ces variations de potentiel redox peuvent entraîner la dissolution de phases porteuses de plomb.

Evans (1989) montre qu'une diminution de la teneur en eau ou en matière organique favorise une augmentation du potentiel redox. Ces réactions d'oxydoréduction influencent fortement le devenir des ETM en solution. Chuan et al (1996) observent une augmentation de la solubilité du plomb et du zinc lorsque le potentiel redox diminue.

4.4.1.3 Influence de la composition minéralogique du sol

Dans la mesure où la mobilité du plomb est majoritairement contrôlée par des phénomènes d'adsorption ou de précipitation/dissolution, elle va être dépendante de la composition minéralogique du sol, notamment de la teneur en phases adsorbante (matière organique, argile, oxydes...). La teneur en carbonates va également affecter la mobilité du plomb. En effet, dans les sols riches en carbonates, le plomb va pouvoir être piégé par simple adsorption à la surface de la calcite ou par précipitation minérale due aux pH élevés de ce type de sol. Veeresh et al (2003) ont étudié l'adsorption de métaux lourds dont le plomb sur 3 types de sol : acides, neutres et alcalins. Les résultats obtenus montrent que les caractéristiques minéralogiques et chimiques des sols neutres et alcalins sont plutôt favorables à un piégeage du plomb par précipitation ou co-précipitation minérale

(carbonates, oxydes..) à l'inverse dans les sols acides, le plomb semble lié à la fraction échangeable et a donc une plus grande mobilité potentielle.

4.4.1.4 Influence des ligands présents dans la phase aqueuse

La teneur et le type de ligands contenus dans la phase aqueuse sont susceptibles de complexer le plomb, augmentant sa mobilité. Ainsi, la présence de matière organique dissoute va avoir tendance à favoriser la migration du plomb vers les horizons profonds du sol, par la formation de complexes organo-minéraux, qui entraînent une limitation de l'adsorption du plomb sur les autres constituants du sol (Sauvé et al, 1998 ; Sterckeman et al, 2000)

4.4.1.5 Influence de la fraction colloïdale

En milieu naturel, le plomb est fréquemment associé à la fraction colloïdale, qui peut être organique (composés humiques) ou inorganique (oxyhydroxydes métalliques). Cette fraction aura tendance à favoriser la mobilité du plomb et à modifier sa biodisponibilité.

4.4.2 Influence des microorganismes sur la spéciation du plomb

Les microorganismes peuvent limiter la mobilité des métaux, par des phénomènes d'adsorption à l'interface solide/liquide, les bactéries jouant un rôle de transport des métaux dans la phase liquide. Elles peuvent aussi augmenter le lessivage et la dissolution des métaux en sécrétant des molécules organiques, qui entraînent une acidification du sol (Ernet, 1996). Le champignon *Aspergillus niger* est capable de solubiliser la pyromorphite et de la transformer en oxalate de plomb hydraté (Sayer et al, 1999).

4.4.3 Influence des plantes sur la spéciation du plomb

Par delà tous les facteurs qui viennent d'être énumérés et qui influencent la mobilité du plomb, la plante joue un rôle aussi prépondérant. Cette thèse étant consacrée aux transferts du plomb dans le système sol-plante, le paragraphe suivant sera entièrement consacré à ces interactions entre le sol et les plantes. La suite de cette revue bibliographique détaillera donc tous ces mécanismes dus à l'activité racinaire.

4.5 Les outils d'investigation

Une étude des concentrations totales en métaux dans les différents compartiments permet d'informer sur le stock total de métaux, mais ne renseigne pas sur la biodisponibilité ou la toxicité, qui peuvent varier selon la spéciation des métaux. La connaissance de la spéciation des métaux est donc essentielle à la connaissance de leur distribution, mobilité et disponibilité biologique. Le terme de spéciation au sens strict est la distribution des espèces chimiques (structure moléculaire, complexe électronique ou nucléaire) d'un élément au sein d'un système solide ou liquide (Dumat, 2003). L'analyse de la spéciation consiste à identifier la ou les formes chimiques de l'élément au sein d'un système donné (Kot et Namiesnik, 2000). Cependant, le terme de spéciation est souvent employé de façon plus large :

- localisation de l'élément dans les phases solides
- aptitude à mobiliser un élément solide par un réactif chimique.

Les méthodes utilisées pour étudier la spéciation sont regroupées en 2 catégories : les méthodes physiques et les méthodes chimiques.

➤ **Méthodes physiques ou directes.**

Certaines sont basées sur les propriétés physiques macroscopiques différentes des constituants du sol (taille, densité,...). il existe également des méthodes d'analyses physiques directes et non destructrices. Elles sont basées sur l'interaction d'un rayonnement incident (électromagnétique, proton, électron, ...) et de la matière. Certaines apportent des informations globales de structure ou de chimie comme la diffraction des rayons X (DRX). Il existe aussi des techniques microscopiques comme les microscopes électroniques à balayage ou à transmission (MEB et MET) couplées à des microsondes électroniques pour l'analyse. Enfin d'autres techniques apportent des informations plus fines comme le degré d'oxydation, l'environnement moléculaire ou le type de liaison chimique (EXAFS, RPE). Ces techniques ont été utilisées par différents auteurs pour montrer l'influence de la spéciation sur le devenir des ETM dans l'environnement (Juillot et al, 1998; Sarret et al., 2001 ;Diyab 2005).

Mais, si ces méthodes permettent de localiser et de déterminer la spéciation exacte des métaux (Ildefonse et al, 1999), elles nécessitent cependant une concentration minimale en métal dans l'échantillon solide assez élevée (plusieurs dizaines de mg.kg^{-1}) ainsi que l'utilisation d'un matériel lourd et coûteux. C'est pourquoi d'autres méthodes qui permettent d'acquérir des informations complémentaires et dont la mise en œuvre est plus aisée ont également été développées

➤ **Méthodes chimiques ou indirectes.**

Les éléments sont extraits de leur contexte structural par des attaques chimiques et une analyse indirecte. On peut pratiquer une extraction chimique unique en fonction du temps ce qui permet de différencier un compartiment labile d'un compartiment peu mobile. Mais on peut également utiliser plusieurs réactifs chimiques de façon séquentielle ou parallèle, avec des extractants de force ionique croissante et de pH décroissant. Ceci permet de distinguer plusieurs compartiments en fonction de l'énergie mise en jeu ou de la nature des phases porteuses. Il existe de très nombreuses procédures d'extractions séquentielles, toutes basées sur celle de Tessier et al, (1979) et qui ont été largement modifiées par différents auteurs (Quevauvillier et al., 1995 ; Ure et al., 1995). Ces techniques font l'objet de critiques dans la littérature, concernant notamment le manque de sélectivité du réactif ou les phénomènes de refixation, reprécipitation ou redistribution des métaux sur les phases solides (Das et al, 1995 ; Raksasataya et al., 1996; Schramel et al., 2000). Pourtant, utilisées avec discernement, ces extractions permettent de caractériser un échantillon de sol dans son ensemble. De plus, les travaux de Ho et Evans (2000) ou de Bacon et al. (2006) ont montré que ces phénomènes ne discréditaient pas les résultats des extractions séquentielles de façon globale. Le Tableau 7 présente un récapitulatif des modes opératoires des techniques d'extractions séquentielles les plus utilisées (Tessier et al, 1979 ; Shuman 1985 ; Quevauvillier et al, 1995; Ure et al, 1995), ainsi

que le mode opératoire qui a été choisi pour ces travaux de thèse, mis au point par Leleyter et Probst (1998).

Tessier et al., 1979	Echangeable	1M MgCl ₂ pH 7
	Carbonates	1M NaOAc / HOAc pH 5
	Oxydes de Fe et Mn	0,04M NH ₂ OH HCl / 25% HOAc
	Matière Organique et Sulfures	30% H ₂ O ₂ / HNO ₃ pH 2 puis 3,2M NH ₄ OAc
Shuman, 1985	Echangeable	1M Mg(NO ₃) ₂ pH 7
	Matière Organique	0,7M NaOCl
	Oxydes de Mn	0,1M NH ₂ OH HCl pH 2
	Oxydes de Fe amorphes	0,2M (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ + 0,2M H ₂ C ₂ O ₄
	Oxydes de Fe cristallins	0,2M (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ + 0,2M H ₂ C ₂ O ₄ + 0,1M C ₆ H ₈ O ₆
Ure et al., 1995	Acido-soluble	0,1M HOAc pH 3
	Réductible	0,1M NH ₂ OH HCl pH 2
	Oxydable	30% H ₂ O ₂ / HNO ₃ pH 2 puis 1M NH ₄ OAc
Quevauvillier et al., 1995	Echangeable	0,1M HOAc
	Oxydes	0,1M NH ₂ OH HCl
	Matière Organique et Sulfures	30% H ₂ O ₂ + 1M HOAc + HF / HNO ₃
	Fraction résiduelle	
Leleyter et Probst, 1998	Hydrosoluble	H ₂ O
	Echangeable	1M Mg(NO ₃) ₂ pH 5
	Carbonates	1M NaOAc / HOAc pH 4,5
	Réduction des Oxydes de Mn	0,1M NH ₂ OH HCl pH 3,5
	Réduction des Oxydes de Fe amorphes	0,2M (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ + 0,2M H ₂ C ₂ O ₄
	Réduction des Oxydes de Fe cristallins	0,2M (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ + 0,2M H ₂ C ₂ O ₄ + 0,1M C ₆ H ₈ O ₆
	Fraction oxydable	35% H ₂ O ₂ / HNO ₃ pH 2 puis 3,2M NH ₄ OAc

Tableau 7 : Modes opératoires des techniques d'extractions séquentielles les plus utilisées

5 Le plomb dans le système sol-plante

Dans les paragraphes précédents, nous avons pu montrer les liens existant entre spéciation, mobilité et phytodisponibilité, ainsi que les différentes influences qui gouvernaient ce lien. Nous allons maintenant nous focaliser sur les influences que la plante peut avoir sur le sol, dans quelles mesures elle est capable de modifier les caractéristiques du sol, particulièrement au voisinage du système racinaire, dans une zone appelée « rhizosphère ».

Les activités urbaines, industrielles et agricoles sont responsables d'une contamination croissante des sols et de l'eau par les ions métalliques. Organisme autotrophe, la plante est totalement tributaire de son environnement minéral. Le sol lui fournit donc la grande majorité de ses nutriments, mais elle est également directement exposée à des éléments potentiellement toxiques.

Les travaux cités précédemment ont montré que le plomb est très sensible au pH. Or, la plante peut modifier le milieu dans lequel elle se développe (modifications de pH, Eh, DOC, etc.) et donc peut influencer la spéciation des métaux présents dans sa rhizosphère. Une connaissance approfondie des systèmes d'acquisition racinaire des métaux ainsi que des mécanismes de résistance des végétaux permettra de comprendre comment les plantes peuvent pousser et survivre sur des zones polluées, mais également de détoxifier certains sols par la phytoextraction ou d'éviter certaines pathologies nutritionnelles en empêchant l'entrée de métaux à des concentrations toxiques dans la chaîne trophique.

5.1 Définition de la rhizosphère

Il est admis que les plantes influencent physiquement et chimiquement leur milieu. Il est donc important d'évaluer les modifications engendrées par les plantes dans le sol et estimer leurs conséquences en matière de biodisponibilité pour la plante. Le terme de rhizosphère a d'abord été défini par Hiltner en 1904 pour décrire la stimulation de la biomasse microbienne dans la région du sol situé à l'interface sol/racine. Depuis, le terme rhizosphère a pris un sens plus général, elle est définie comme « *le volume du sol soumis à l'influence de l'activité racinaire* » (Darrah, 1993). Ce volume de sol varie avec la nature des plantes, en particulier l'extension du système racinaire et ses propriétés de surface, les éléments nutritifs considérés et les propriétés physiques du sol (Alloway, 1995).

Pour les éléments peu mobiles, la rhizosphère se limite aux premiers millimètres de sol situés autour des racines (Hinsinger, 1998). La rhizosphère est le lieu d'activités biologiques et biochimiques intenses (Figure 4). La plante prélève de l'eau et des éléments nutritifs nécessaires à sa croissance et elle libère diverses substances minérales et organiques (exsudats racinaires). Les racines elles-mêmes sont capables de mobiliser les métaux contenus dans les phases solides du sol par modification des concentrations ioniques de la rhizosphère, du potentiel redox et du pH ou par formation de complexes organométalliques (Hinsinger, 1998 ; MacLaughlin, 1998 ; Hinsinger 2001 ; Dumat, 2006, HDR de l'INPT).

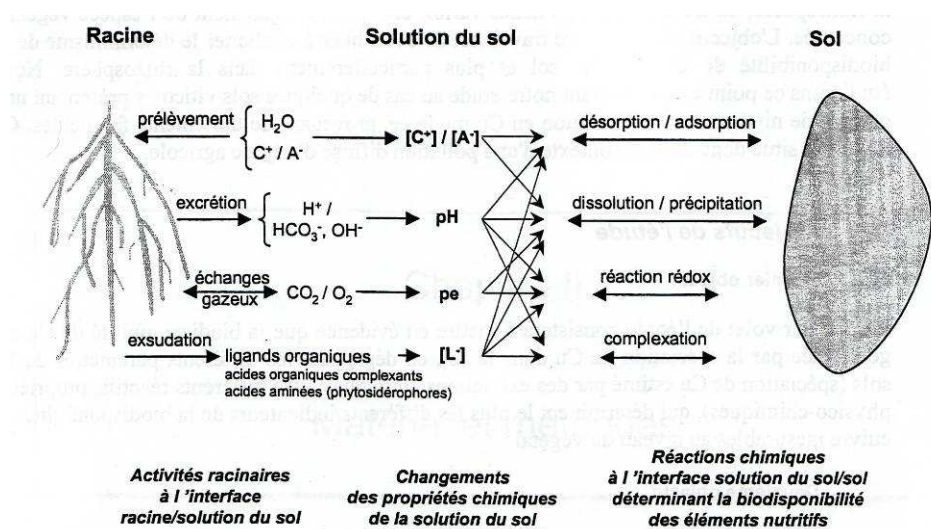


Figure 4 : Interactions chimiques ayant lieu dans la rhizosphère (Hinsinger, 2001)

5.2 Mécanismes d'interaction sol-plante : impact des activités racinaires

5.2.1 Modification du pH

Le prélèvement des nutriments par les racines peut affecter le pH du sol. Le sens de modification induit dépend pour partie du type de prélèvement réalisé par la plante. En effet, pour maintenir leur neutralité les plantes doivent compenser leur absorption ionique par une excrétion de charges au niveau racinaire (Romheld et al., 1984) :

- Quand elles prélèvent davantage de cations que d'anions, les racines compensent en relâchant un excès de charges positives (H^+) dans la rhizosphère, ce qui entraîne alors une acidification du milieu (Lasat, 2002).
- Dans le cas contraire, la plante relâche des ions hydroxydes ou bicarbonates (Hinsinger, 2001) et induisent une augmentation de pH.

L'azote est l'élément nutritif prélevé en plus grande quantité par la plante (Marschner, 1995), et peut être prélevé sous forme d'anion nitrate (NO_3^-) ou de cation ammonium (NH_4^+), ou même sous forme neutre (N_2) chez certaines plantes comme les légumineuses, en association avec des bactéries fixatrices d'azote. La nutrition azotée joue donc un rôle majeur dans le bilan de charges de la plante. Ainsi, les plantes prélevant NH_4^+ ou N_2 comme source d'azote ont tendance à acidifier leur rhizosphère, alors que celles qui prélèvent plutôt NO_3^- tendent à l'alcaliniser (Romheld et al., 1984 ; Hinsinger, 1998). Cependant, on peut relever quelques exceptions, comme le colza, le sarrasin ou le lupin, qui peuvent acidifier leur rhizosphère alors qu'elles ont une alimentation nitrrique (Hinsinger, 1998).

Par ailleurs, la respiration racinaire augmente la pression partielle de CO_2 dans la rhizosphère contribuant une fois encore à son acidification (Nye, 1986 ; Hinsinger, 1998). La contribution de ce dernier phénomène à l'acidification rhizosphérique est particulièrement importante dans les sols calcaires ou dans des sols où la diffusion du CO_2 se fait mal (Nye, 1986), par contre, dans les sols

acides, l'acide carbonique n'est pas dissocié et la contribution de la respiration racinaire à l'acidification de la rhizosphère est alors négligeable.

En résumé, les plantes peuvent modifier la chimie et la biodisponibilité des éléments traces dans le sol, dont le plomb, en modifiant le pH de la rhizosphère. En effet, le pH est impliqué dans de multiples réactions se déroulant dans le sol, telles que les réactions de dissolution/précipitation ou d'adsorption/désorption, ou encore de complexation. Tous ces mécanismes peuvent donc induire la libération de certains éléments traces initialement immobilisés dans les minéraux, les changements de pH provoquant la dissolution par exemple de carbonates, d'oxydes ou de phosphates.

5.2.2 Modification des concentrations ioniques dans la rhizosphère

Le prélèvement d'eau et d'éléments nutritifs en solution entraîne une modification des concentrations en ions dans la solution du sol au niveau de la rhizosphère (Hinsinger, 2001). Cela est surtout vrai pour les macroéléments que les plantes absorbent en plus grande quantité que les oligoéléments

5.2.3 Exsudation d'acides organiques dans la rhizosphère

5.2.3.1 Définition

L'exsudation de composés organiques par les racines est un phénomène important. Le terme d'exsudats racinaires est un nom générique donné à une large gamme de substances allant des ions H^+ à des molécules complexes d'un poids moléculaire élevé. Il s'agit des mucilages qui sont décrits comme étant du matériel gélatineux formé de polysaccharides, des aminoacides, des peptides et des acides organiques excrétés par les racines dans la rhizosphère (Morel, 1997). Ils constituent 30 à 40% des produits de la photosynthèse de la plante et jouent un rôle central dans les processus rhizosphériques.

Leurs natures varient selon les espèces végétales, l'association avec des microorganismes, et les conditions de croissance de la plante (Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

5.2.3.2 Nature

Ces molécules peuvent être de faible poids moléculaire, comme les sucres, les acides organiques et phénoliques ainsi que les acides aminés (Marschner, 1995). Mais il existe également des exsudats racinaires à poids moléculaire élevé tels que les mucilages, les ectoenzymes et les protéines.

La production d'acides varie selon l'espèce végétale et le stade de développement de la plante, mais les plus complexants sont les acides citrique, malique et oxalique (Hinsinger et al., 2005), même s'il en existe de nombreux autres types.

5.2.3.3 Rôle

Ces exsudats racinaires entrent en jeu dans:

- La nutrition de la plante : ils influencent la mobilité des éléments nutritifs dans le sol
- La régulation du développement de la plante. En outre, ils favorisent les associations plantes/microorganismes du sol (par exemple les bactéries symbiotiques fixées sur les racines des légumineuses)
- La protection des zones apicales des racines grâce aux mucilages
- L'amélioration des contacts sol-plantes
- La modification des conditions physico-chimiques de la rhizosphère (force ionique, concentration en carbone organique dissous, pH et potentiel redox).

L'excrétion de ces acides peut être la conséquence d'une carence en élément essentiel (Jones, 1998) ou bien un moyen défensif contre la toxicité d'un élément. Ils ont la capacité de complexer les métaux et également d'augmenter la mobilité du fer, du manganèse, du cuivre, du plomb et du zinc (Mench, 1988 ; Marschner, 1995 ; Jones, 1998).

L'exemple des sols calcaires est souvent cité. En effet, dans ces sols, le fer et le phosphore sont peu disponibles, entraînant des carences nutritionnelles. Les plantes calcicoles s'adaptent en excréant les acides malique et citrique qui permettent la dissolution des oxydes de fer, afin de le rendre plus disponible (Marschner, 1995 ; Jones, 1998 ; Hinsinger, 2001). Les travaux de Neuman et Romheld (1999) montrent qu'en cas de déficience en phosphore, le lupin augmente sa production d'acide citrique. D'autres travaux ont montré que le colza excrète des quantités importantes d'acides organiques afin de mobiliser le phosphore des roches phosphatées.

Un deuxième exemple intéressant est l'excrétion par les graminées déficientes en fer d'acides aminés non protéinogéniques ou phytosidérophores (acide avénique) (Kochian, 1993 ; Fan et al., 1997). Ils ont une très forte affinité pour le Fe^{3+} et extraient très efficacement ce fer de la rhizosphère. Le complexe Fe-phytosidérophores est ensuite réabsorbé par la racine, le fer Fe^{3+} réduit en Fe^{2+} , puis libéré et utilisé par la racine (Hopkins, 2003). Leur synthèse et leur libération sont stimulées en réponse à une inhibition de la synthèse des protéines due à une carence en fer (Marschner et Romheld, 1994). Ces phytosidérophores ont, outre le fer, la capacité de complexer d'autres nutriments, en particulier les métaux traces comme le plomb.

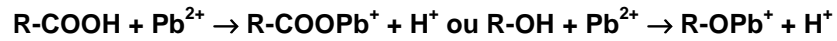
5.3 Réaction entre les acides organiques et les métaux dans la rhizosphère

Les acides organiques peuvent favoriser la solubilisation des métaux dans le sol, qui se retrouvent alors dans la solution du sol et peuvent être absorbés par les plantes ou d'autres organismes vivants. Par exemple, ils peuvent provoquer la libération du manganèse des oxydes et du

fer de la goethite, de la ferrihydrite, mais aussi le fer constitutif des oxydes mal cristallisés (Liu et Huang, 2003).

Wu et al (2003) ont montré que 60 mg.kg⁻¹ d'acide citrique entraînent la désorption du plomb de la surface de la montmorillonite (16% du plomb désorbé) et de la goethite (27%).

Le plomb réagirait avec les acides organiques dans la solution du sol selon les réactions suivantes :



Avec R-COOH: acide carboxylique; R-OH: alcool ou phénols (ligands organiques).

6 Le plomb dans la plante

Les plantes peuvent absorber du plomb à partir des racines, mais également à partir des organes aériens, ou bien par l'intermédiaire des deux. Les quantités de métal absorbées par les racines dépendent de la concentration et de la spéciation du métal dans la solution du sol, mais également de ses capacités de migration du sol vers la surface des racines. Ensuite, la quantité de plomb présente dans les divers organes d'une plante dépend du transport de l'extérieur des racines vers l'intérieur, puis de sa translocation des racines vers les feuilles (Patra et al., 2004).

6.1 Notion de phytodisponibilité

La notion de phytodisponibilité découle de la biodisponibilité, qui peut être définie comme « l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment du sol vers un organisme vivant (bactérie, végétal, animal, homme) » (Baize, 1997). Lorsque l'organisme vivant est une plante, on parle de phytodisponibilité (Tremel-Schaub et Feix, 2005). Selon Hinsinger et al. (2005), est biodisponible pour une plante, la fraction d'un élément qui est susceptible d'être absorbée par les racines. Pour Kabata-Pendias et Pendias (1992), la phytodisponibilité des éléments traces est fortement corrélée à la concentration d'espèces ioniques dans la solution du sol. Elle est également largement dépendante des propriétés du sol, de l'espèce végétale considérée et de l'élément en question.

Toujours selon Hinsinger et al. (2005), la phytodisponibilité dépend des différents paramètres permettant le transfert de la phase solide du sol vers le végétal :

- La disponibilité ou mobilité chimique
- L'accessibilité ou mobilité physique
- L'assimilation ou mobilité biologique

Pour estimer la phytodisponibilité, la mobilité de l'élément ainsi que sa concentration dans la solution du sol sont des éléments déterminants, mais pas suffisants (Loué, 1993). En effet, certaines fractions adsorbées non spécifiquement ou faiblement complexées peuvent aussi être biodisponibles.

A priori, le meilleur outil pour mesurer la biodisponibilité des éléments en trace est l'organisme lui-même. La plante devrait donc permettre de révéler la phytodisponibilité des éléments en trace dans le sol. La mesure consiste donc à déterminer la teneur en élément dans les tissus végétaux à la récolte. Cette teneur est proportionnelle, mais pas nécessairement égale à la teneur totale en élément biodisponible. Certains tests pour mesurer les effets de polluants sur les plantes ont été normalisés tels que le test de germination (AFNOR X31-201) ou de croissance (AFNOR X31-502). Ces méthodes sur les plantes s'avèrent cependant très lourdes et peu réalistes lorsqu'il s'agit de réaliser un grand nombre de mesures, mais peuvent être envisagées pour des études ciblées. Leur emploi est assez délicat dans la mesure où les tests sont longs à mettre en œuvre et sont difficilement utilisables en routine.

Lorsque les tests sur les plantes ne peuvent pas être mis en place, la phytodisponibilité des métaux peut être évaluée en utilisant différents extractants chimiques. Tout d'abord des agents

chélatants, tels que le DTPA ou bien de l'EDTA à 0,01M. On peut également utiliser des solutions salines neutres comme CaCl_2 , NH_4OAc ou NH_4NO_3 qui extraient les métaux par échanges cationiques (Brun et al., 1998 ; McLaughlin et al., 2000), mais également des solutions acides diluées telles que HNO_3 , HCl ou HOAc (Li et al, 2007).

Selon Jin et al. (2005), la phytodisponibilité du plomb doit être évaluée grâce à des solutions non tamponnées, comme le CaCl_2 0,01M en raison de sa bonne corrélation avec les concentrations en Pb dans les plantes. De plus, cet extractant n'affecte pas les propriétés du sol, en particulier le pH lors de l'extraction. Cependant, selon Li et al. (2007), l'efficacité du CaCl_2 serait trop faible. Ces auteurs ont démontré dans une étude sur des sols de rizières que l'utilisation du NH_4OAc 1M était un meilleur moyen d'estimer la biodisponibilité du plomb dans les plantes.

Il est également possible de réaliser des extractions séquentielles, en utilisant des extractants de force ionique croissante, pour solubiliser successivement les fractions de plus en plus liées au sol. Cependant, ces dernières restent largement critiquées, en particulier à cause de phénomènes de ré-adsorption des métaux qui auraient pu être libérés dans les étapes précédentes. Mais malgré toutes les réserves émises, les extractions chimiques qu'elles soient simples ou séquentielles sont des approches expérimentales intéressantes pour appréhender la disponibilité potentielle des métaux.

Cependant, lorsqu'elle est possible, l'analyse de végétaux ayant poussé sur sol contaminé est une mesure directe de la phytodisponibilité. Cette méthode plus longue a l'avantage d'intégrer l'ensemble des phénomènes mis en jeu et d'apporter une mesure et non une estimation de la phytodisponibilité.

6.2 Absorption

6.2.1 Structure des racines

La structure des racines (Figure 5), longitudinalement, de l'apex (pointe) vers la base est constituée de:

- La coiffe, composée de cellules subérisées se renouvelant constamment. Cette coiffe joue un rôle de lubrifiant améliorant la pénétration de la racine dans le sol, grâce à la sécrétion d'un mucilage (polyosides).
- Le méristème apical, qui est une zone de multiplication cellulaire, où se fait la croissance primaire des racines.
- La zone d'élongation principale des cellules, et de différenciation des tissus racinaires
- Le rhizoderme (ou épiderme racinaire), qui est une zone contenant les poils absorbants permettant d'augmenter la surface d'absorption de l'eau et des éléments minéraux.
- L'exoderme, qui est la zone de lyse des cellules du rhizoderme.

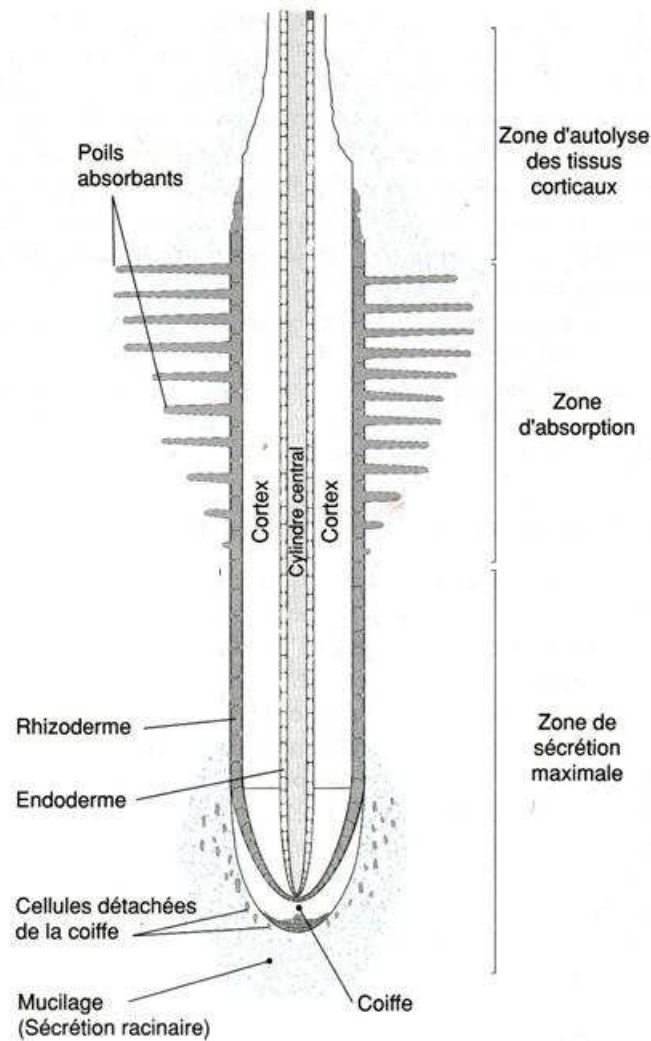


Figure 5 : Coupe longitudinale de racine (Gobat et al., 1998)

Tansversalement, de l'extérieur vers l'intérieur les racines sont constituées de plusieurs couches successives (Figure 6) :

- L'exoderme
- Le cortex
- L'endoderme
- Le cylindre central ou stèle, qui contient les vaisseaux.

6.2.2 Mécanismes d'absorption

Dans le sol, l'absorption racinaire correspond au prélèvement par la plante des éléments minéraux du milieu extérieur et elle peut se faire de plusieurs manières.

Soit la pénétration des éléments dans les racines se fait grâce à un transport actif interne par le symplaste (cytoplasmes des cellules reliés entre eux par les plasmodesmes). Après avoir traversé

la paroi cellulaire, les ions métalliques atteignent la surface de la membrane plasmique, puis pénètrent dans le symplaste. Ensuite, ces ions métalliques peuvent passer d'une cellule à l'autre en empruntant les plasmodesmes, qui relient les cellules. C'est la voie dite symplastique.

Ce transport peut aussi se faire par voie passive ou apoplastique, c'est-à-dire par un transport dans les espaces intercellulaires (ou Espaces Libres Apparents). Ce phénomène s'arrête le plus souvent au niveau de l'endoderme, du fait de la présence de cadres de subérines, ou bandes de Caspary, qui bloquent le passage des molécules et des ions. A ce moment là, l'eau et les molécules sont obligées de traverser les membranes plasmiques des cellules de l'endoderme, afin de pouvoir parvenir dans le cylindre central contenant les vaisseaux du xylème. Après avoir traversé la membrane plasmique de la face interne de l'endoderme, les ions peuvent à nouveau reprendre le chemin apoplastique. Il reste néanmoins possible qu'une faible partie de l'absorption des ions se fasse par l'apoplasme complètement. En effet, certaines cellules de l'endoderme, nommées cellules de transfert ne sont pas subérifiées.

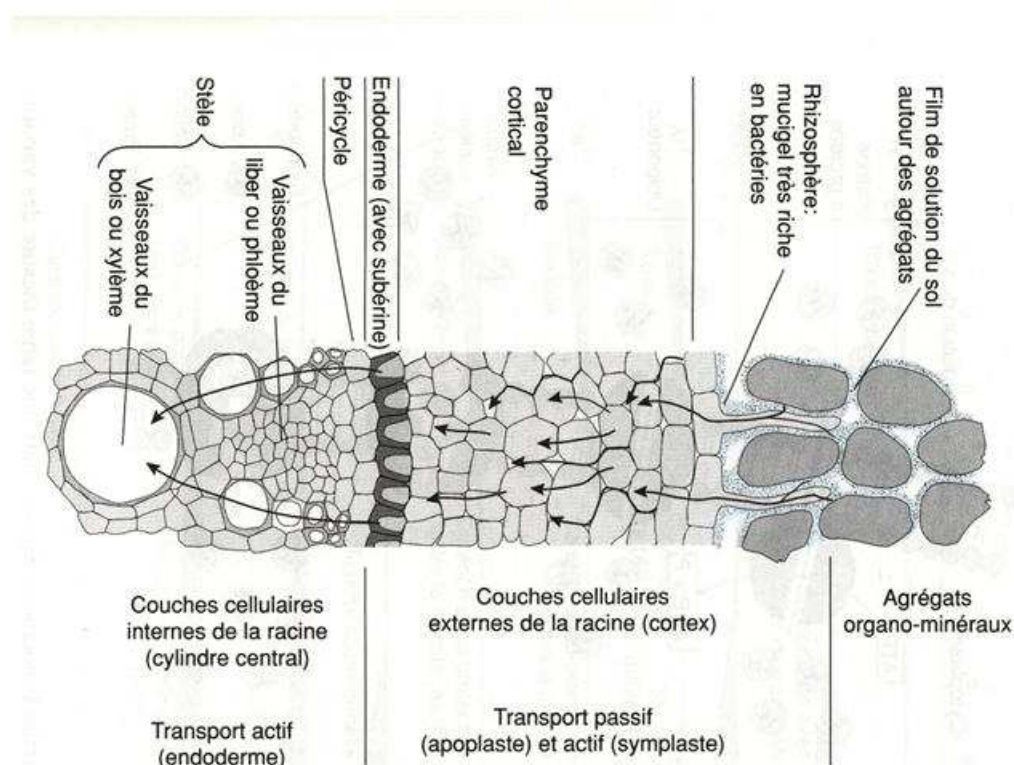


Figure 6 : Coupe transversale de racine, avec le passage des ions selon les voies symplastiques et apoplastiques (Gobat et al, 1998).

Cas du plomb :

Au départ, le Pb^{2+} présent dans la solution du sol se lie aux groupements carboxyle de l'acide uronique composant le mucilage autour des racines (Sharma et Dubey, 2005). Ce mucilage permet donc de restreindre le passage du plomb à l'intérieur des cellules racinaires, et constitue ainsi une protection du système racinaire. Une fois adsorbé à la surface des racines, la voie apoplastique pourrait être une voie importante pour le plomb qui peut être immobilisé par les charges négatives des

parois cellulaires (espace libre de Donnan). Il aurait donc tendance à s'accumuler dans l'espace libre, étant fortement lié aux groupements carboxyliques des composés pectocellulosiques des parois. Des études ont montré que le plomb était majoritairement présent dans l'apoplaste et que seule une faible proportion pénétrait dans l'endoderme (Tung et Temple, 1996 ; Seregin et al., 1998 ; Patra et al., 2004).

6.3 Transfert du plomb du sol vers les racines

La pénétration d'un élément dans une plante peut être évaluée par le facteur de transfert sol/plante ou également appelé facteur de bioconcentration, noté FBC. Il représente la possibilité de transfert d'un contaminant du sol vers les plantes, et il est généralement défini comme le ratio entre la concentration dans les plantes et celle dans le sol où ont poussé les plantes, et calculé comme suit (Chumbley and Unwin, 1982 ; Cui et al, 2004, Zheng et al, 2007) :

$$FBC = [Pb]_{\text{plante}} / [Pb]_{\text{substrat de culture}}$$

avec les concentrations exprimées en mg.kg^{-1} et relatives aux masses sèches du sol et des plantes. Plus la plante absorbe facilement le plomb, plus le facteur de transfert est grand. Ce transfert du sol vers les plantes est fonction :

- de la nature du métal (Zheng et al, 2007),
- de la nature des plantes (de l'espèce ou du cultivar) et également de leur âge (Yoon et al, 2006),
- des caractéristiques des sols telles que le pH, la teneur en matière organique, ou la capacité d'échange cationique (Roselli et al, 2003 ; Yoon et al, 2006 ; Zheng et al, 2007). D'après Roselli et al (2003), la mobilité des métaux et donc leur transfert est faible dans le sol, surtout si le pH ou la teneur en matières organiques sont élevés.

Bien que le facteur de transfert soit assez largement utilisé dans les études portant sur l'impact de la contamination d'un sol sur les plantes, il existe de nombreuses ambiguïtés quant à son calcul. Tout d'abord, même s'il est la plupart du temps calculé à partir de la teneur totale en métal dans le sol, certains auteurs suggèrent que l'utilisation du métal biodisponible est plus judicieuse (Brun et al., 1998 ; McLaughlin et al., 2000 ; Pichtel et al., 2000). Elle permet selon eux de mieux prédire le transfert potentiel du plomb du sol vers les plantes, en comparaison avec les teneurs totales.

Une autre ambiguïté dans le calcul de ce facteur de transfert réside dans la manière de calculer la concentration dans la plante. En effet, après la récolte de plantes ayant été en contact direct avec le sol, les racines sont soigneusement rincées avant de procéder à la minéralisation et au dosage. Ce rinçage n'est jamais complet et il est possible que des particules de sols soient analysées en même temps que les tissus des racines. En effectuant ce rinçage avec des solutions acidulées, il est possible de réaliser également une désorption acide, qui permet de détacher le plomb adsorbé à la surface des racines. Chaignon et Hinsinger (2003) par exemple utilisent cette technique pour la désorption du cuivre. Cette quantité retrouvée dans la désorption représente souvent une majorité du

plomb total de la plante. On peut donc se poser la question de savoir s'il faut tenir compte de cette quantité désorbée pour calculer le facteur de transfert. En effet, ce plomb n'a pas pénétré à proprement parler dans la plante, cependant, il est malgré tout étroitement lié aux racines et donc peut à terme être absorbé.

Certains auteurs tels que Zheng et al. (2007) calculent d'ailleurs plusieurs facteurs de transfert dans une même étude dans des sols contaminés environnant une usine de métallurgie. Dans un premier temps, ils ne tiennent compte que des parties comestibles des végétaux, en utilisant pour cela les concentrations dans ces organes végétaux, mais sur une base de matière fraîche. Ils obtiennent alors des facteurs de transfert allant de 0,001 pour l'aubergine à 0,025 pour l'épinard ou le poireau, en passant par 0,003 pour le haricot rouge, dans des sols contenant en moyenne 320 mg.kg^{-1} de plomb. Ces résultats montrent l'influence de l'espèce végétale dans le transfert du sol vers les plantes, en effet, pour un même sol à chaque fois, les données sont très différentes selon l'espèce considérée. Dans un deuxième temps, ils calculent également des facteurs de transfert dans les parties non comestibles des plantes. Dans ce cas là, le facteur de bioconcentration est calculé pour chaque organe séparément en utilisant les concentrations par rapport à la matière sèche. Ceci entraîne un facteur beaucoup plus élevé, qui passe à 0,032 dans le fruit du haricot rouge et à 0,265 dans les racines de ces mêmes plantes par exemple. Une étude de Yanqun et al (2004) dans une zone minière de Chine reporte des concentrations moyennes de $133,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ Pb dans des plantes endémiques pour des concentrations moyennes en plomb dans le sol autour de 1630 mg.kg^{-1} , ce qui donne un facteur de transfert moyen de 0,08, en considérant la concentration dans les plantes entières (en matière sèche). Les travaux de Fytianos et al. (2001) sur la contamination de légumes cultivés dans une zone industrielle de Grèce ont mis en évidence des facteurs de transfert allant de 0,07 pour la carotte à 0,46 pour les épinards. Là aussi, ils utilisaient la concentration totale dans les plantes calculée sur une base de matière sèche.

Cette ambiguïté sur le calcul des concentrations totales dans les plantes est assez peu soulignée dans la littérature, mais ces quelques résultats soulèvent une constatation majeure. Ceci démontre l'importance des paramètres pris en compte dans le calcul du facteur de transfert, qui est à adapter en fonction de l'objectif visé par l'étude : santé humaine liée à la consommation de végétaux (risques sanitaires) ou risques environnementaux de propagation des toxiques dans les chaînes alimentaires.

6.4 Translocation du plomb des racines vers les parties aériennes

Après l'absorption par les racines, la translocation correspond au transfert des éléments traces métalliques vers les parties aériennes. Elle peut varier considérablement en fonction du métal, mais également de l'espèce végétale. Pour être conduits vers les parties aériennes, les éléments prélevés dans le sol par les racines doivent être transportés dans le cortex puis déversés dans les vaisseaux du xylème (par circulation de la sève brute). Ce flux d'ions métalliques dans le xylème nécessite leur chélation à des acides organiques (tels que le citrate) ou à des acides aminés (comme l'histidine) (Briat et Lebrun, 1999).

Pour la plupart des espèces, la majorité du plomb absorbé par les plantes réside dans les racines, et seulement une faible proportion est transloquée vers les parties aériennes. Ce transport limité des racines vers les feuilles peut être expliqué par la barrière formée par l'endoderme des racines. Les bandes de Caspary peuvent en effet être un facteur majeur limitant le franchissement de l'endoderme jusqu'au cylindre central (Seregin et al, 2004 ; Sharma et Dubey, 2005). Pour illustrer ce propos, différents auteurs ont défini un facteur de translocation, qui est calculé comme suit (Mattina et al., 2003 ; Tanhan et al., 2007):

$$[\text{Pb}]_{\text{parties aériennes}} / [\text{Pb}]_{\text{racines}}$$

Yoon et al (2006) dans une étude des concentrations en métaux dans des plantes natives sur un site contaminé ont montré que dans 95% des cas, les concentrations en plomb dans les racines étaient beaucoup plus élevées que dans les feuilles, soulignant une faible mobilité du plomb des racines vers les parties aériennes et donc une immobilisation dans les racines. De plus, ils trouvent des facteurs de translocation assez faibles, avec une valeur moyenne de 0,58, indiquant que les plantes séquestrent le plomb dans les parties racinaires et limitent le transport interne, des racines vers les parties aériennes. De même, Del-Rio Celestino et al (2006) ont trouvé des facteurs de translocation compris entre 0 et 0,7 dans des plantes sauvages ayant poussé sur du sol artificiellement contaminé avec 500 mg Pb.kg⁻¹. Quant à Ding et Pan (2003), ils ont montré que s'ils retrouvaient du plomb dans les parties aériennes de plantes ayant poussé sur site contaminé, au moins 50% était d'origine atmosphérique. Pour Verkleij et al (1990), cette restriction du transport vers les parties aériennes représente un facteur de tolérance des plantes à la présence de contaminants dans leur milieu de culture. En effet, il est important que le moins de plomb possible soit transféré vers les feuilles, car c'est un élément toxique, notamment pour l'activité photosynthétique, pour la synthèse de chlorophylle ou encore pour la synthèse d'enzymes anti-oxydantes (Kim et al, 2003).

Ceci n'est cependant pas vrai pour les espèces hyperaccumulatrices, qui ont la capacité de transloquer une grande quantité du plomb vers les parties aériennes (Seregin et Ivanov, 2001), et qui présentent donc des facteurs de translocation supérieurs à 1 (Baker, 1981).

6.5 Toxicité

La toxicité du plomb dépend de sa concentration dans le milieu, de sa spéciation, des propriétés du sol, et enfin de l'espèce végétale concernée. Les plantes mettent en place diverses barrières physiques pour se protéger. Tout d'abord le mucilage sécrété au niveau de la coiffe, qui a la capacité de lier le plomb et donc de gêner son adsorption aux parois cellulaires. Mais pour pouvoir pénétrer dans la racine jusqu'au cylindre central, il doit également passer à travers la paroi cellulaire et la membrane plasmique qui possèdent de nombreux sites de fixation pour le plomb. Quand le plomb a réussi à passer à travers ces barrières de protection, il peut affecter de nombreux processus physiologiques de la plante. Les premiers effets ne provoquent pas de symptômes visibles, ceux-ci ne se manifestant qu'en cas de toxicité avancée.

6.5.1 Action sur les activités enzymatiques

Le plomb peut inhiber l'action de certaines enzymes, notamment celles qui possèdent un groupement –SH, ce dernier présentant une forte affinité pour le plomb. Dans la plupart des cas, l'inhibition se fait par interaction du plomb avec ce groupement qui est indispensable pour l'activité et le bon fonctionnement des enzymes. Le plomb affecte donc la conformation de nombreuses enzymes, les empêchant de fonctionner convenablement (Seregin et Ivanov, 2001). Parmi les enzymes fondamentales qui peuvent être inhibées par le plomb, se trouvent des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle ou bien la RUBISCO qui permet la fixation du CO₂ (Seregin et Ivanov, 2001 ; Patra et al, 2004). L'inhibition de ce type d'enzyme entraîne une forte perturbation de la photosynthèse. Ceci entraîne une réduction de la teneur en chlorophylle ainsi que celle de tous les pigments photosynthétiques, et également une croissance réduite des feuilles. Une concentration plus élevée en plomb provoque une substitution de l'atome de magnésium au centre de la molécule de chlorophylle par un atome de plomb, provoquant un arrêt de la photosynthèse (Kupper et al., 1996). La photosynthèse reste de ce fait un des mécanismes les plus affectés par la présence du plomb.

6.5.2 Effets sur la nutrition minérale

Le plomb affecte également la nutrition minérale, en perturbant le prélèvement et le transport des nutriments par la plante, tels que Ca, Fe, Mg, Mn, P et Zn en bloquant leur entrée ou en se liant à eux, les rendant indisponibles pour les plantes (Xiong, 1997). Burzynski (1987) a montré que la présence de plomb entraînait une diminution du contenu en potassium dans tous les tissus du concombre, ainsi qu'une diminution du calcium dans les cotylédons et l'hypocotyle, mais aussi du fer dans les racines. Le plomb affecte aussi le métabolisme azoté en diminuant le prélèvement de nitrate et en perturbant le fonctionnement de la nitrate reductase (Seregin et Ivanov, 2001).

6.5.3 Stress hydrique

Le plomb peut également affecter l'état hydrique de la plante, en provoquant un stress hydrique, notamment par la fermeture des stomates. Cette fermeture des stomates a un impact sur divers processus dans la cellule, tel que la photosynthèse, en induisant une déficience en CO₂. Le stress hydrique s'exprime également par une réduction de la surface foliaire, ainsi que globalement de tous les organes sièges de la transpiration, afin de limiter les pertes en eau. On observe ensuite un flux transpiratoire diminué, une pression osmotique plus faible ou un potentiel hydrique réduit dans le xylème. Le plomb provoque une perte globale de turgescence et de plasticité, et enfin une réduction globale du contenu en eau de la plante (Parys et al., 1998).

6.5.4 Génération de stress oxydant

Un des effets très importants provoqué par le plomb dans les cellules est la génération de stress oxydant, qui est défini comme un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants, en faveur des premiers et source d'effets toxiques potentiels (Sies, 1991). Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), normalement produites dans les cellules se retrouvent en excès.

Ces espèces réactives de l'oxygène incluent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) ou encore le peroxyde d'hydrogène. Le stress oxydant entraîne un ralentissement de la croissance végétale, mais également des dommages moléculaires en interagissant avec des substrats biologiques (dénaturation de protéines, inactivation d'enzymes, des cassures au niveau de l'ADN...). Les travaux de Pourrut et al. (2008) démontrent une induction d'espèces réactives de l'oxygène dose dépendante dans des racines de fèves exposées à une solution plombée contenant 1 mg.kg^{-1} de plomb sous forme $Pb(NO_3)$. La première étape de l'induction de stress oxydatif étant la production de $O_2^{\cdot-}$. Pour Schützendübel et Polle (2002) le stress oxydant peut être généré par l'inactivation de certaines enzymes, par fixation sur leur groupement $-SH$ ou par déplacement d'ions métalliques essentiels à l'enzyme.

Pour combattre ces ERO, les cellules végétales disposent de deux grands types de défense:

- **Un système enzymatique**, visant à détruire les ERO :
 - Les superoxydes dismutases (SOD) qui peuvent éliminer l'anion superoxyde par dismutation, pour former de l'oxygène et de l'eau.
 - Les catalases, qui détruisent le peroxyde d'hydrogène, en aboutissant également à la formation d'oxygène et d'eau.
 - Les peroxydases, détruisant également le peroxyde d'hydrogène en formant de l'eau.
- **Un système non enzymatique**, avec des macromolécules capables de piéger ces ERO :
 - Le glutathion (GSH) est le plus abondant chez les êtres vivants.
 - L'acide ascorbique
 - Les tocophérols
 - Les caroténoïdes

Lorsque le stress oxydant est trop important, la capacité des enzymes antioxydantes est dépassée, provoquant un excès de radicaux. Cet excès va entraîner des lésions sur les molécules telles que l'ADN, les protéines ou les lipides. A ce moment là, l'apparition des symptômes visibles a lieu, notamment un brunissement des racines, ainsi que des chloroses et des nécroses sur les feuilles, entraînant une perturbation de la croissance pouvant aller jusqu'à la mort de l'organisme.

6.5.5 Croissance et morphogénèse

Globalement, le plomb affecte la croissance et la morphogénèse des plantes, en perturbant de très nombreux mécanismes physiologiques. Il inhibe fortement la germination et la croissance des plantes, entraînant la formation de plantes de taille réduite. Le plomb affecte considérablement la morphologie des racines, en diminuant la taille des racines primaires ainsi qu'en réduisant le nombre de racines secondaires. L'inhibition de la division et de l'élongation cellulaire sont les phénomènes les plus souvent reportés pour expliquer ces effets du plomb sur les racines (Seregin et Ivanov, 2001 ; Malkowski et al, 2002 ; Patra et al., 2004 ; Kopittke et al., 2007). Ceci avait déjà été mis en évidence il y a près de 80 ans par Hammett (1929) qui avait montré une diminution de l'index mitotique dans les

racines de maïs et d'oignon, provoquée par la présence de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, et qu'il avait expliqué par la fixation du plomb sur les groupements $-\text{SH}$ des protéines.

Les concentrations en plomb toxiques pour les végétaux varient considérablement selon les études. En effet, cette toxicité dépend fortement des interactions du plomb avec les espèces végétales considérées, mais également du mode de culture et des facteurs environnementaux. Les travaux de Rooney et al. (1999) ont montré que pour des concentrations extractibles à l'EDTA dans un sol atteignant 800 mg.kg^{-1} , la croissance du Raygrass n'était pas affectée. Päivöke (2002), quant à lui a montré que la toxicité du plomb vis-à-vis du pois dépendait fortement de l'âge de la plante en plus de la concentration en plomb dans le sol. Cependant, il reporte des effets néfastes sur la croissance des plantes pour des concentrations en plomb inférieures à 500 mg.kg^{-1} . Liu et al. (2003) ont démontré que la sensibilité ou la tolérance des plantes au plomb était cultivar-dépendante. En effet, leurs travaux réalisés sur différents cultivars de riz mettent en évidence des retards de croissance et de développement provoqués par 800 mg.kg^{-1} , mais uniquement pour certains cultivars, d'autres n'y étant pas sensibles. Ceci démontre bien que la toxicité du plomb dépend fortement du comportement des plantes vis-à-vis de ce métal.

En hydroponie, les données sont différentes, le plomb étant connu pour être toxique à de plus faibles concentrations. Malkowski et al. (2002) ont montré que la croissance du maïs était inhibée par la présence de $10 \mu\text{M}$ de plomb dans la solution de culture. Fodor et al. (1996) et Wozny and Jerzynska (1991) ont également mis en évidence la toxicité de $10 \mu\text{M}$ de plomb en solution sur la croissance et de développement du concombre et du haricot respectivement. Kopittke et al (2007) dans une étude réalisée sur la cornille (une plante de la famille des fabaceae, proche du haricot) montrent que les racines sont plus sensibles que les parties aériennes à l'exposition au plomb. En effet, la production de biomasse racinaire est inhibée dès $0,1 \mu\text{M}$ de plomb dans la solution, avec une apparition de symptômes visibles sur les racines à partir de $1,5 \mu\text{M}$. L'inhibition de la biomasse des parties aériennes se manifestant quant à elle à partir de $0,3 \mu\text{M}$.

6.5.6 Altération de l'ADN due au stress oxydant

L'ADN, structure moléculaire dépositaire du patrimoine génétique est une macromolécule possédant une structure complexe (formée de paires de bases reliées entre elles). Elle est très sensible à l'attaque des radicaux libres. Ceci revêt un caractère particulièrement critique compte-tenu du rôle clé de cette molécule dans l'expression et la transmission de l'information génétique. L'atteinte de l'ADN implique le franchissement préalable de toutes les barrières de défense mises en place par les végétaux, la potentialité de détoxification des cellules ou de l'organisme et enfin du potentiel des systèmes de réparation de l'ADN de l'organisme.

Divers effets peuvent alors être observés:

- Une formation de bases oxydées
- Des sites abasiques qui sont une partie de l'ADN dépourvue d'une base purique ou pyrimidique et ayant perdu l'information génétique par rupture de la liaison entre une base et le désoxyribose.

- Des cassures au niveau des brins d'ADN, qui peuvent être double ou simple brin.
- Apparition d'adduits à l'ADN. Ils correspondent à la formation de produits d'addition entre le polluant et les nucléotides (**adduits** pour addition et **produits**), suite à la peroxydation des lipides.
- Des pontages ADN-protéine

Ces lésions au niveau de l'ADN entraînent des ruptures de chromosomes en fragments acentriques générant des micronoyaux lors de la division cellulaire. Ce sont des entités nucléaires indépendantes qui se retrouvent hors du noyau, dans le cytosol (Lagadic et al, 1997). Ils apparaissent sous forme de petits noyaux à côté du noyau principal. Les lésions au niveau de l'ADN peuvent également provoquer des aberrations chromosomiques, c'est-à-dire un nombre ou une structure anormale des chromosomes, mais également des échanges de chromatides sœurs, qui consiste en un échange symétrique entre le matériel chromosomique entre 2 chromatides sœurs.

Les micronoyaux peuvent aussi résulter d'un dysfonctionnement au cours de la division cellulaire gênant la migration chromosomique (Cotelle et Ferrard, 2001). Ils proviennent alors de chromosomes entiers ou de fragments et qui, du fait de leur migration incomplète, se retrouvent hors du noyau.

Les agents capables de générer des dommages sur l'ADN sont dits génotoxiques. Le caractère génotoxique des micropolluants pourrait constituer la composante majeure de la toxicité à long terme, c'est-à-dire des perturbations lentes mais irrémédiables, dues à une exposition prolongée des populations à des contaminations, même à de très faibles niveaux (Chenon, 2001). Ces micropolluants affectent les individus ou leur descendance en modifiant le patrimoine génétique des espèces. Ce qui pourrait avoir un impact sur la reproduction, le développement des populations ainsi que sur leur biodiversité en affectant des gènes essentiels.

Pour évaluer cette génotoxicité des polluants, des tests de génotoxicité ont été mis en place, c'est-à-dire des tests permettant la détection de la capacité d'une substance ou d'un processus physique à générer des dommages sur le matériel génétique. Ce sont en général des tests mono-spécifiques qui consistent à mesurer la réponse des organismes. Ces tests ont surtout été développés sur des modèles expérimentaux comme des systèmes cellulaires ou des organismes entiers. Ils peuvent notamment être réalisés sur des plantes sélectionnées et homogènes lors de leur exposition à des polluants et ils permettent l'établissement de courbes « concentration/réponse » après exposition des organismes à des quantités croissantes de polluants (Chenon, 2001).

Divers tests existent, tels que le test d'Ames (Ames et al., 1973), conduit avec des souches de *Salmonella typhimurum*. Un des gènes codant pour la synthèse de l'histidine est inactivé, empêchant sa synthèse et une seconde mutation provoquée par le polluant étudié restaure cette synthèse. Il existe également le test mutatox qui a pour but de détecter la présence d'agents mutagènes dans un produit testé. Ce test mesure la fréquence d'apparition d'une mutation portant sur la bioluminescence d'une bactérie marine. Enfin, il existe des tests permettant la détection d'aberrations chromosomiques. Un test, mis au point en 1981 par Randerath, permet la détection d'adduits à l'ADN. C'est une

méthode de radiodétection où l'ADN est marqué *in vitro* après extraction. Un marquage au ^{32}P permet de détecter les adduits par autoradiographie. Il existe également des tests permettant de détecter les cassures au niveau des brins d'ADN, tel que le Comet Assay, mis au point par Singh en 1988 et dans lequel les cellules, incluses dans de l'agarose sont lysées puis soumises à une électrophorèse. Au cours de cette dernière, l'ADN nucléaire présentant des cassures migre de façon hétérogène, les brins d'ADN vont migrer de façon plus importante que le noyau. Après un marquage fluorescent, on peut observer une image en forme de comète présentant une tête (contenant l'ADN intact) et une queue (contenant l'ADN fragmenté) (Menke et al., 2000). Ce test largement utilisé sur les cellules sanguines animales peut également être appliqué à des cellules végétales (Cotelle et al., 1999). Enfin, il existe le test dit des micronoyaux, auquel est consacré le paragraphe suivant, et qui fait l'objet d'une partie de ces travaux de thèse.

L'emploi de ces différents tests a permis de montrer que la plupart des métaux pouvaient avoir des effets génotoxiques. Les travaux de Qun et Xiao (1995) sur *Vicia faba* par exemple, ont montré que pour des concentrations supérieures à 1 mg.kg^{-1} de Pb dans le milieu de culture, l'indice mitotique (ou nombre de cellules en division pour 100 cellules) diminuait et le nombre d'aberrations chromosomiques augmentait. De même, des travaux de Bhowmik et Sharma (2000) sur différentes plantes, ont montré pour des concentrations en plomb allant de 0,001 à 1 mg.kg^{-1} de Pb, une réduction progressive de l'index mitotique et une augmentation des aberrations chromosomiques.

6.5.7 Test des micronoyaux

Le test de numération des micronoyaux a été proposé comme marqueur biologique d'effets génotoxiques (Knasmüller et al., 1998). C'est un test ancien, car l'analyse des micronoyaux était déjà utilisée par Evans et al. dès 1959 pour évaluer des dommages génétiques chez *Vicia faba* (Bekaert, 1999). Actuellement, c'est un biomarqueur régulièrement utilisé en écotoxicologie, terme qui peut être défini de la façon suivante: «Les biomarqueurs désignent des changements structuraux ou fonctionnels, observables et mesurables, qui prennent place à divers niveaux de l'organisation biologique depuis la molécule jusqu'à l'organisme pris dans son intégralité, qui traduisent une exposition persistante ou passée d'un individu à une ou plusieurs substances polluantes.» (Lagadic et al., 1997)

Cet essai *in vivo* est bien validé pour étudier le pouvoir génotoxique de milieux naturels liquides ou de lixiviats de matrices solides (sol, sédiments, ...) (Chenon, 2001). Il a été d'abord mis au point sur le triton (équipe Jaylet, 1986), normalisé en 1992 par l'AFNOR. Ce test a ensuite été étendu au Xénope par Zoll et al. en 1988 et a obtenu une norme AFNOR en 2000 (Chenon, 2001). Pour le réaliser, on expose les organismes aux substances que l'on veut tester, puis on laisse croître pendant une période suffisante pour permettre que la fragmentation chromosomique forme des micronoyaux dans les cellules en interphase.

Les végétaux supérieurs sont également de bons systèmes génétiques pour évaluer et surveiller les polluants environnementaux (Missini et al., 1997). C'est un test simple, reproductible demandant peu de matériel. De plus, il détecte des effets mutagènes très faibles (Missini et al., 1997).

Sur les plantes trois bioessais existent :

- un sur *Vicia faba* (fève), réalisé sur les apex racinaires et normalisé par l'AFNOR en 2004 (NF T90-327), en milieu liquide.
- un sur *Allium cepa* (oignon) également réalisé sur les racines
- un sur les tétrades contenues dans les poils des étamines de *Tradescantia*, très sensible car réalisé sur des cellules germinales. Celui-ci est très utilisé pour évaluer la contamination de sols, pour contrôler leur réhabilitation ou pour évaluer l'impact des traitements utilisés en agriculture sur la pollution des sols (Bekeart, 1999).

Le test des micronoyaux est essentiellement utilisé sur des matrices liquides, du fait de sa sensibilité et de sa simplicité d'utilisation. Les racines des plantes sont placées au contact de la solution à tester pendant quelques heures, puis les cellules sont fixées, colorées, et examinées au microscope. Il a été utilisé pour tester la génotoxicité de nombreux contaminants. Yi et al. (2007) par exemple, ont démontré grâce à ce test, la génotoxicité du sélénium, qui provoque une augmentation dose dépendante du nombre de micronoyaux. Feng et al. (2007) l'ont utilisé pour démontrer la toxicité de résidus d'incinération de décharge municipale, contenant divers métaux lourds. Ils démontrent également que les plus fortes concentrations entraînent une cytotoxicité. El Hajjouji et al. (2007) ont quant à eux montré la génotoxicité de résidus de fabrication d'huile d'olive, qui contiennent de nombreux composés phénoliques.

Certains auteurs ont voulu se rapprocher des conditions naturelles et ont décidé de réaliser ce test après une exposition directe à des sols. Les résultats obtenus sont alors contradictoires dans la littérature. Si Jain et al. (2004) ou Missini et al. (1998) ont constaté effets génotoxiques après exposition à des sols contaminés, Knasmüller et al (1998) n'ont pas mis en évidence d'induction de micronoyaux dans les apex de *Vicia faba* exposés à des sols industriels avec des contaminations métalliques, de même que Missini et Lombard (1997) avec des sédiments contaminés du Tibre.

6.6 Mécanismes de tolérance

Seules les plantes qui ont développé des mécanismes de tolérance peuvent survivre à un environnement contaminé. Elles développent en général deux grands types de stratégies. Le mécanisme le plus répandu est l'évitement du stress métallique par exclusion, qui se fait par fixation du métal sur la paroi cellulaire ou bien par sécrétion de chélates. Ceci a pour but de limiter au maximum le prélèvement par les racines, mais également de limiter un éventuel transport des racines vers les parties aériennes. De nombreux auteurs suggèrent que cette restriction a lieu grâce à l'endoderme, qui fonctionne comme une barrière au transport radial du plomb dans la racine, et de ce fait restreint son mouvement vers les organes supérieurs (Seregin et Ivanov, 2001). Pour Kopittke et al (2007), d'autres facteurs entrent en jeu, notamment une immobilisation du plomb dans la paroi cellulaire, par fixation sur les pectines, chargées négativement. Une partie de ce plomb peut alors se déplacer à travers la membrane et atteindre le symplaste.

Une deuxième stratégie est donc mise en place par les plantes, qui consiste à détoxifier le plomb qui a pénétré. La tolérance au stress métallique dépendra donc de l'efficacité des mécanismes

internes qu'elles mettent en place. Ces mécanismes peuvent être (Patra et al., 2004 ; Do Nascimento et Xing, 2006):

- la séquestration des métaux grâce à des composés organiques spécialement synthétisés
- la compartimentation dans certains compartiments cellulaires (tels que les vacuoles)
- la détoxification grâce à des chélates.

Les mécanismes de tolérance interne ne sont pas encore parfaitement connus, mais la chélation du plomb dans le cytoplasme et la séquestration dans les vacuoles seraient des mécanismes prépondérants. La vacuole est en effet considérée comme le lieu principal de stockage du plomb (Tong et al., 2004). Selon Wierzbicka et Antosiewicz (1993), ces vacuoles peuvent en effet contenir plus de 96% du métal. Ceci permet de diminuer considérablement la quantité de métal dans le cytoplasme, compartiment cellulaire à forte activité métabolique

Des ligands spécialement synthétisés en cas de stress métalliques sont capables de se lier au plomb une fois dans le cytoplasme, pour former des complexes stables, qui peuvent ensuite être séquestrés dans les vacuoles. Les plus connus sont des protéines telles que les métallothionéines ou les phytochélatines, ainsi que des acides organiques de faible poids moléculaires.

- Méthallothionéines

Ce sont des petites molécules qui séquestrent certains ions métalliques en excès (Rauser, 1999). Elles ont d'abord été identifiées comme peptides liant le cadmium dans les cellules végétales (Salt et al., 1995). Mais actuellement quelques gènes codant pour les métallothionéines ont été identifiés chez les végétaux (Yang et al., 2005).

- Phytochélatines

Chez de nombreuses espèces, l'entrée de métaux toxiques dans le cytoplasme induit la synthèse de composés appelés phytochélatines. Ce sont donc des polypeptides dérivés de la glutathione (GSH), composés de cystéine. La présence de plomb induit la phytochélatine synthase ainsi que les gènes *gsh1* et *gsh2* responsables de la synthèse du glutathion, précurseurs des phytochélatines (Rauser, 1990; Seregin et al., 2001). Les travaux de Gisbert et al (2003) montrent que des plantes transgéniques qui surexpriment ces gènes précurseurs du glutathion présentent une plus grande tolérance aux métaux que les plantes sauvages. Cette tolérance ne s'accompagne pas d'une baisse de prélèvement du plomb, ni d'une baisse de la translocation. Ceci confirmerait le rôle d'inactivation joué par les phytochélatines. Ce sont des composés pourvus d'un groupement -SH et d'un groupement -COOH qui sont capables de complexer les métaux présents, puis de les transférer dans les vacuoles, puits très importants pour la séquestration des éléments toxiques dans les cellules racinaires, ou bien transportés vers les parties aériennes. Des travaux de Grill et al. (1987) sur des cultures cellulaires de *Rauvolfia serpentina* ont essayé d'évaluer les niveaux de métaux provoquant une induction de la synthèse de ces phytochélatines. Ils ont montré qu'elle avait lieu pour 1mM de Pb^{2+} et Zn^{2+} ; 100μM de Cd^{2+} , Ni^{2+} ou Sn^{2+} ; 50μM de Ag^{2+} et Cu^{2+} ; 20μM de AsO_4^{3-} et enfin 10μM de Sb^{3+} .

Des acides organiques sont également des ligands potentiels pour la chélation du plomb, grâce à la capacité du plomb à réagir avec N, S et O. Il a été montré que le citrate, le malate et l'oxalate étaient impliqués dans différents processus métaboliques, pouvant inclure la tolérance aux métaux, le transport dans le xylème ou la séquestration dans les vacuoles (Rauser, 1995 ; Shah et Nongkynrih, 2007).

Il a été également mis en évidence l'implication du calcium dans la tolérance au plomb. Dès 1981, Karataglis montrait que de fortes teneurs en calcium dans un sol diminuaient la toxicité de certains métaux et notamment du plomb. Le plomb étant un élément non essentiel, il ne doit pas posséder de canaux spécifiques sur les membranes, et des études ont montré qu'il pourrait emprunter les canaux calciques (Huang et Cunningham, 1996). Clemens et al. (1998) ont montré que le blocage des canaux calciques entraînait également un blocage du prélèvement du plomb. Pourrut et al. (2008) montrent une inhibition du stress oxydatif provoqué par le plomb grâce à des applications simultanées de plomb et de calcium dans le milieu extracellulaire, suggérant une compétition entre ces deux types d'ions au niveau de l'entrée dans les cellules. Ces observations permettent de conclure que le plomb aurait une forte affinité pour les sites de fixation du calcium (Antosiewicz, 2005).

Globalement l'effet de toxicité du plomb sur le métabolisme cellulaire des plantes dépend de la concentration en Pb^{2+} . Cette concentration quand à elle, dépend à la fois de la concentration externe en métal et de l'efficacité des systèmes de protection de la plante. Quand les systèmes de protections sont dépassés les mécanismes du stress oxydatif sont déclenchés.

7 Synthèse et conclusions

Les activités urbaines, industrielles et agricoles sont responsables d'une contamination croissante des sols et de l'eau par les éléments traces, notamment le plomb. Dans les sols, les teneurs naturelles en plomb sont en moyenne de 32 mg.kg^{-1} (Alloway, 1995), et varient entre 2 et 200 mg.kg^{-1} . En France, les teneurs naturelles, hors anomalies géochimiques, varient entre 9 et 50 mg.kg^{-1} (Baize, 2002). Certaines activités anthropiques peuvent augmenter ces concentrations en plomb dans les sols.

Dans les années 80 par exemple, la quantité de plomb introduite dans l'atmosphère par les activités humaines était 18 fois plus importante que la quantité de plomb naturel. Jusqu'au début des années 1990, la principale source de plomb provenait de l'utilisation de composés plombés comme anti-détonnant dans l'essence et on estime que 95% de la pollution atmosphérique en plomb provenait du plomb des essences. Actuellement cette source de plomb a été supprimée puisque l'utilisation du plomb dans les essences a été interdite, ce qui a considérablement diminué la quantité de plomb introduite dans l'atmosphère. Cependant, le plomb dans l'atmosphère provient également de l'industrie, principalement sous forme de sulfure de plomb (galène), des débris industriels et de certains pesticides. La principale utilisation du plomb reste actuellement les batteries plomb/acide pour automobiles qui doit inévitablement être recyclé. Cette thèse est focalisée sur l'impact de ces activités de recyclage.

Plus que les concentrations totales dans les sols, la spéciation des éléments en trace est une des données fondamentales qui contrôle leur migration, leur disponibilité et donc leur toxicité. Le devenir des éléments en trace est essentiellement commandé par des processus d'incorporation dans des phases solides et/ou à la surface de ces solides (minéraux, colloïdes, polymères, micro-organismes). En effet, le plomb est lié aux phases solides du sol par adsorption, précipitation et par formation de complexes. Il présente une forte réactivité vis-à-vis des oxydes de fer et de manganèse, mais également vis-à-vis des phosphates et de la matière organique. (Hettiarachchi&Pierzynski, 2002). Ces interactions avec la phase solide du sol contribuent à la réduction de la solubilité et de la mobilité du plomb dans le sol (Badawy et al, 2002). Ainsi le plomb est décrit dans la littérature comme étant peu mobile dans les sols, nous avons voulu approfondir cette question en se positionnant sur un site contaminé depuis 40 ans et en recherchant les facteurs qui jouent sur sa mobilité. Nous proposons d'abord une approche globale du profil de sol dont les conclusions sont vérifiées par des méthodes d'investigation complémentaires plus directes.

La pression anthropique croissante entraîne la mise en contact des plantes avec le plomb. Le prélèvement du plomb par les plantes est lié à sa biodisponibilité qui peut être définie comme la quantité d'un élément du sol pouvant être absorbée par un organisme. La phytodisponibilité est donc contrôlée par différents facteurs liés au sol (forme chimique de l'élément, composition du sol), aux conditions du milieu (température, humidité) mais également à l'espèce végétale (Zheng et al, 2007). En effet, les plantes peuvent fortement modifier leur environnement, soit en libérant des protons soit par le biais d'exsudations racinaires de composés organiques complexants, ou bien encore par la

respiration racinaire. Ces mécanismes entraînent une acidification du sol dans la rhizosphère et modifient ainsi la phytodisponibilité des éléments traces dans le sol (Hammer et Keller, 2002). L'absorption racinaire crée des gradients de concentration, modifie la force ionique de la solution du sol et déplace des équilibres d'adsorption et de mobilité.

Les plantes sont donc en mesure de modifier chacun des paramètres du sol, influant sur le devenir de métaux toxiques, comme le montre la Figure 7, qui représente la dynamique du plomb à l'interface sol/plante. De nombreux travaux relatent ces interactions entre les plantes et la biodisponibilité du plomb, mais peu d'auteurs les ont quantifiées. Un de nos objectifs a été de mesurer l'augmentation de la phytodisponibilité du plomb dans la rhizosphère.

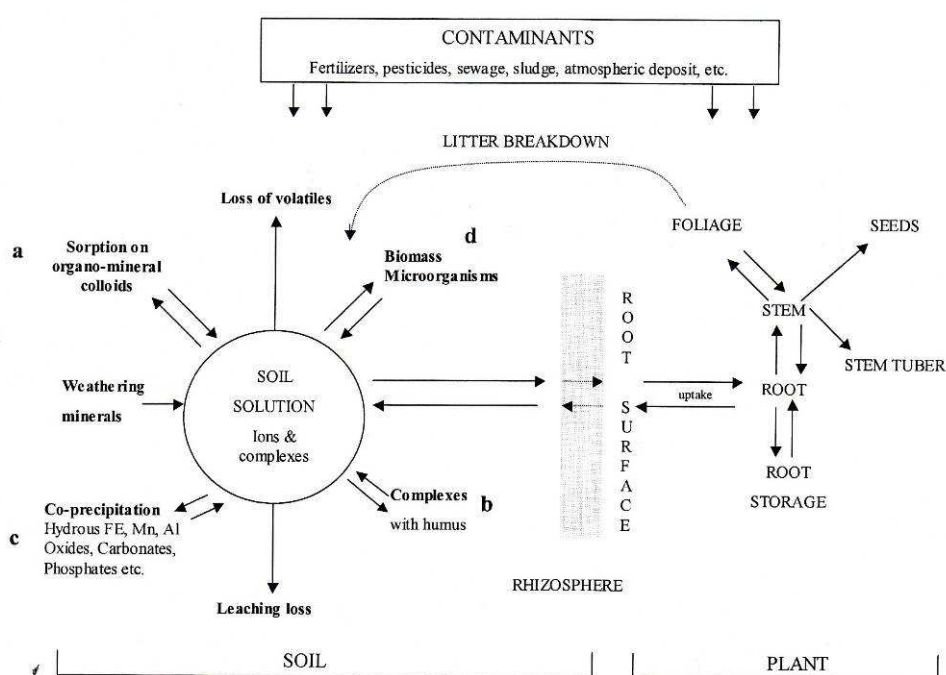


Figure 7 : Dynamique des éléments traces métalliques dans le système sol/plante (d'après Alloway, 1995).

Le plomb arrive donc à la surface des racines et avant d'être absorbé par les cellules racinaires, il peut se lier aux groupements carboxyliques de la paroi, et former de petits agrégats à la surface de ces parois. Cette fixation réduit au maximum sa pénétration dans le cytoplasme des cellules sans l'empêcher complètement. Un autre objectif était donc d'évaluer cette quantité de plomb adsorbé à la surface des racines et de la comparer avec le plomb absorbé et susceptible d'avoir un impact beaucoup plus marqué sur la physiologie de la plante.

La majorité des plantes séquestrent le plomb dans leurs racines, mais une partie peut malgré tout être transférée vers les parties aériennes. Le plomb est transporté de cellules à cellules dans le cortex, par voie symplastique, puis il est déversé dans les vaisseaux et conduit vers les parties aériennes.

Le plomb exerce un effet toxique non spécifique sur l'ensemble du métabolisme cellulaire (photosynthèse, état hydrique, croissance et développement). Enfin, le plomb peut être toxique en activant les formes réactives de l'oxygène pour aboutir à la formation d'espèces radicalaires. Ces dernières, en réagissant avec les molécules essentielles de l'architecture du vivant telles que les acides nucléiques, les protéines ou les lipides, engendrent des dégâts cellulaires, comme des mutations chromosomiques, la formation de micronoyaux ou la peroxydation des lipides. Il peut en résulter une altération des fonctions vitales, conduisant à la mort cellulaire. Tous ces désordres métaboliques se manifestent dans les cellules bien avant l'apparition des symptômes visibles que sont les chloroses, les nécroses, ou une croissance ralentie du végétal, entraînant une chute du rendement.

Le prélèvement d'ETM par les plantes dépend de l'intensité de l'exposition (concentration, temps de croissance), des formes chimiques des polluants dans le sol et de la plante (espèce, variété). Ces deux points s'ils ont déjà été étudiés méritaient des travaux supplémentaires afin d'apporter des éléments complémentaires pour la compréhension des mécanismes. Peu de travaux relatent du transfert du plomb dans les plantes potagères sur des sites contaminés en France. C'est en effet une étape indispensable pour améliorer les tests et protocoles existants ou en proposer de nouveaux plus pertinents dans les évaluations de risques sanitaires liés aux sols pollués.

Dans ce contexte et au vu de la toxicité du plomb, les objectifs de cette thèse étaient donc d'évaluer l'impact d'une usine de recyclage du plomb dans les sols environnant, mais également d'évaluer sa mobilité potentielle, puis ses effets toxiques pour les végétaux.

Après une partie récapitulant les matériels et méthodes employés, la troisième partie de ce manuscrit est consacrée à une étude détaillée du comportement du plomb le long d'un profil de sol, prélevé dans l'enceinte de l'usine. Ensuite, la quatrième partie est consacrée au comportement du plomb dans le système sol-plante. Pour cela, le transfert du sol vers les plantes a été évalué grâce à des expériences sur un dispositif de microculture. Outre le transfert, ce dispositif nous a également permis d'étudier l'influence des racines sur le sol rhizosphérique. Enfin, la dernière partie est une étude des effets du plomb sur les plantes, évalués selon 2 modes de culture des plantes. Tout d'abord par exposition des plantes à des lixiviats de sol, l'hydroponie étant un mode de culture largement utilisé dans les études de toxicité. Cependant, l'utilisation de ces lixiviats peut introduire un biais dans les résultats, car ils nécessitent une manipulation du sol, de plus, ces conditions de culture sont assez éloignées de celles retrouvées dans l'environnement. Dans une récente synthèse White et Claxton (2004) établissent une comparaison de très nombreux travaux montrant que l'exposition directe de *Vicia faba* à des contaminants génère toujours beaucoup moins de micronoyaux qu'en milieux liquide. En revanche aucun auteur n'a encore soulevé ce paradoxe. Une comparaison des effets du plomb selon les conditions de culture semblait donc intéressante. Les effets génotoxiques ont d'abord été étudiés grâce au test des micronoyaux, puis des observations microscopiques des racines de plantes et un dosage du plomb dans la sève ont été réalisés.

PARTIE II : Matériels et Méthodes

Ce chapitre sera consacré à la présentation des matériels et méthode généraux utilisés pour ces travaux de thèse.

Certaines techniques seront ensuite détaillées dans les chapitres de résultats où elles ont été utilisées.

1 Site d'étude

1.1 Description de l'usine

La STCM est la filiale française du groupe ECO BAT technologies Ltd, spécialiste et leader mondial du plomb. Son activité consiste à traiter les produits contenant du plomb en fin de vie. Elle les transforme en plomb pur ou en alliages de plomb utilisés pour fabriquer de nouveaux produits. C'est donc le maillon principal de la chaîne de recyclage du plomb.

L'approvisionnement de la STCM est principalement constitué de batteries usagées collectées sur le marché français. Les produits de la STCM approvisionnent ensuite en majorité les fabricants d'accumulateurs qui en France consomment au total plus de 200 000 tonnes de plomb doux et d'alliages.

En France, la STCM possède 4 usines (Figure 8) : une à Toulouse (31), une à Pont-Ste-Maxence (60) et deux à Bazoches-les-Gallérandes (45)



Figure 8: Localisation des différentes usines de la STCM en France

La première usine a été créée en 1952 à Toulouse. Ensuite, la demande s'est faite de plus en plus forte dans le nord de la France (en particulier au nord de la Loire). C'est pourquoi une deuxième usine a été créée, à Bazoches-les-Gallérandes, dans la Beauce. Rapidement, cette usine s'est avérée trop petite et un second site (B2 : tri et fusion) a été créé dans le même village, le premier site étant actuellement destiné uniquement à l'affinage (B1).

1.2 Activité

Le procédé de recyclage du plomb est en constante amélioration car actuellement le plomb de 2^e fusion est davantage utilisé que le Pb de première fusion. Environ 20 000 tonnes sont recyclées par l'usine de Toulouse et plus de 28 000 tonnes à Bazoches. Et elles emploient plus de 90 personnes dont 14 cadres. Toutes les équipes ont des compétences étendues dans les domaines de la chimie, de la métallurgie, de la mécanique ainsi que dans les techniques de filtration et de traitement des eaux.

À la fonderie, le minerai est tout d'abord grillé pour oxyder le sulfure et obtenir de l'oxyde de plomb ; le soufre est éliminé sous forme de dioxyde gazeux (SO_2) transformé et valorisé en acide sulfurique. Le minerai grillé est alors introduit, avec du coke, dans un four à la base duquel on souffle de l'air. La réaction de l'oxygène de l'air avec le coke donne du monoxyde de carbone CO , qui réduit l'oxyde de plomb. À la base du four s'écoulent d'une part le plomb liquide, d'autre part les scories généralement granulées à l'eau avant d'être mises en décharge. Le plomb recueilli à ce stade est appelé plomb d'œuvre ; il contient un certain nombre d'impuretés (cuivre, argent, bismuth, antimoine, arsenic, etc.) qu'il faut éliminer. Cet affinage du plomb, encore liquide, se fait dans des cuves, par refroidissement et ajout de divers réactifs (soufre, oxygène, zinc pour capturer l'argent, etc.). Le plomb affiné (appelé plomb doux) est coulé et solidifié dans des lingotières avant d'être expédié chez le consommateur ou dans des entrepôts de stockage. Avant la coulée finale, des éléments peuvent être ajoutés en proportions bien définies pour élaborer des alliages (calcium, antimoine, etc.). Dans certaines fonderies, on utilise à côté des concentrés miniers, des matières premières issues du cassage des batteries, ou des sous-produits d'autres procédés industriels (sulfate de plomb par exemple).

1.3 Localisation

Le site se trouve près du village de Bazoches-les-Gallérandes en bordure de la départementale D927, au sud, immédiatement à la sortie est du village. Le village est situé en limite ouest du département du Loiret à 80 km au sud de Paris (Figure 9). La région appartient à la grande plaine de la Beauce.



Figure 9: Localisation du site d'étude

Le lieu de prélèvement se trouve dans l'enceinte du bâtiment B1 qui est situé dans un secteur classé zone industrielle sur le Plan d'Occupation des Sol de la commune. Il est encadré à l'est par une station d'épuration municipale. Au sud, de l'autre côté de la D927, se trouve un silo de stockage de produits agricoles. À l'ouest, le site est bordé par un terrain classé également en zone industrielle, ce terrain séparant l'usine de l'agglomération.

Les immeubles d'habitation, situés à plus de 200 m vers l'ouest ne sont pas sous les vents dominants.

2 Prélèvement des échantillons

2.1 Fosse pédologique

Le sol dans l'enceinte de cette usine avait déjà été étudié lors de précédentes investigations du LARA Europe sol Analyses en 1999. Des prélèvements de sol avaient été réalisés à différentes profondeurs dans la pelouse environnant l'usine. Ils avaient également réalisé des prélèvements tout autour de l'usine à des distances croissantes. Ces prélèvements ont mis en évidence une contamination qui est maximale près de l'usine, et qui diminue avec éloignement de la source émettrice, formant une patatoïde avec l'usine au centre. Cette répartition des concentrations en plomb est également soumise à l'influence des vents dominants.

Le 17 février 2005, une fosse pédologique a été creusée à l'emplacement du sondage N°8 de 1999, à l'intérieur de l'usine B1 (Figure 10). Ce point a été choisi en fonction des concentrations en plomb trouvées lors de ces analyses qui s'élevaient à environ 1600 mg.kg^{-1} en surface. La fosse mesure environ 1,50 m de longueur, 1,50 m de largeur et 1,60 m de profondeur.



Figure 10: Réalisation de la fosse pédologique

2.2 Prélèvement des échantillons

Un échantillonnage a été réalisé tous les 10 cm jusqu'à la marne, à 130 cm de profondeur, de haut en bas du profil (Figure 11). Pour chaque échantillon, environ 2 kg de terre sont prélevés. A chaque prélèvement, des précautions sont prises afin de ne pas contaminer les couches inférieures du sol, en évitant notamment tout matériel en métal.



Figure 11 : Profil de sol prélevé

L'observation directe du profil de sol, sur le terrain a permis de distinguer 4 horizons différents (Figure 12) :

- Un horizon A de 0 à 25 cm, de couleur brun foncé due à la présence de matière organique
- Un horizon S de 25 à 90 cm, de couleur un peu orangée, due à la présence d'argile. Cette argile est présente dans les phyllosilicates qui sont issus de l'altération de la marne.
- Un horizon C de 90 à 110 cm, qui est un horizon intermédiaire, d'altération de la marne
- Un horizon R ou la marne, à partir de 110 cm

	Description	Couleur
25 cm	Très forte porosité 50%, beaucoup de racines Structure presque granuleuse, polyédrique subanguleuse, Horizon A	7.5 YR 4/3
90 cm	Structure prismatique Porosité se referme (15-20%) Horizon S, structural	7.5 YR 5/8
110 cm	Horizon C sur 20 cm Altération de la marne	10 YR 6/6
	Marne R (roche mère)	10 YR 8/3

Figure 12 : observation et description directe du profil de sol réalisée sur le terrain lors des prélèvements.

2.3 Préparation des échantillons

Les échantillons de sol sont mis à sécher à l'air libre pendant une semaine, puis quartés afin de disposer d'échantillons homogènes. Ils sont ensuite broyés et tamisés à 2mm grâce à un tamis en inox. Cette fraction à 2 mm est de nouveau quartée et une partie d'environ 200 g est prélevée afin d'être re-broyée puis tamisée avec un tamis en inox de 200 μ m. Ceci nous permet d'obtenir une poudre plus fine de manière à augmenter les surfaces d'attaque lors des extractions séquentielles.

2.4 Echantillons

Nous disposons donc pour la suite des travaux de 13 échantillons numérotés comme suit, chacun tamisés à 2 mm et broyés à 200 μ m :

1 : 0-10 cm	4 : 30-40 cm	7 : 60-70 cm	10 : 90-100 cm	13 : 120-130 cm
2 : 10-20 cm	5 : 40-50 cm	8 : 70-80 cm	11 : 100-110 cm	
3 : 20-30 cm	6 : 50-60 cm	9 : 80-90 cm	12 : 110-120 cm	

3 Analyses de sol

Un premier objectif de ce travail de thèse était de caractériser le sol tant au niveau pédologique qu'au niveau du comportement des polluants tout le long du profil.

Après une analyse pédologique classique (pH, CEC, teneur en matière organique, en carbonates...) réalisées par le LARA Europe Analyses, des extractions à l'eau régale ont été effectuées afin de connaître les concentrations pseudo-totales en éléments majeurs et trace au sein du profil du sol.

Cependant, le comportement du plomb dans l'environnement (biodisponibilité, toxicité et distribution) ne doit pas être estimé uniquement à partir de sa concentration totale. En effet, sa spéciation chimique, c'est à dire la forme chimique sous laquelle il se trouve, influence fortement sa mobilité et sa biodisponibilité (Tokalioglu *et al.*, 2003). Une technique très utilisée pour déterminer la spéciation au sens large d'un élément est basée sur l'utilisation des extractions chimiques séquentielles et sélectives. Le principe de ces extractions successives est présenté sur la Figure 13, il consiste à ajouter à l'échantillon étudié un extractant adapté en maintenant une agitation constante. Une fois la réaction finie, on sépare le lessivât du résidu qui subit ensuite l'extraction suivante. La procédure d'extractions séquentielles employée lors de ces travaux de thèse est celle développée par Leleyter *et al* (1998), qui comporte 7 étapes successives.

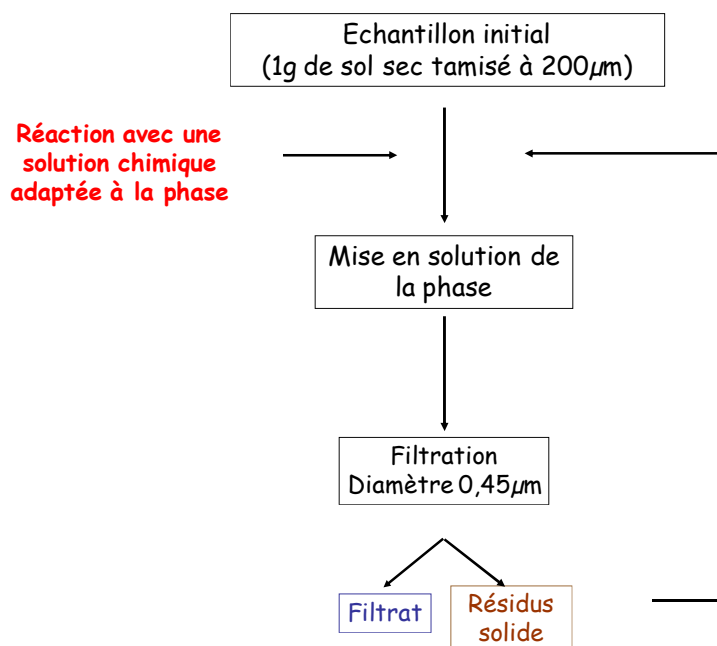


Figure 13: Principe de la procédure d'extractions chimiques séquentielles

Actuellement, les protocoles d'extraction séquentielle ne font pas l'objet d'un consensus au sein de la communauté scientifique. En effet, il existe de nombreux protocoles d'extractions chimiques (voir le paragraphe 4-5 de la synthèse bibliographique), ce qui rend la comparaison des résultats difficile. Cependant, l'objectif de ces travaux de thèse n'était pas de mettre au point un nouveau protocole d'extractions séquentielles, mais de choisir un protocole bien adapté aux caractéristiques du sol étudié. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser le protocole mis au point par Leleyter et Probst (1998), car il présente l'avantage de posséder une étape destinée à extraire la fraction liée aux carbonates. Ceci paraissait être un argument majeur, vu la teneur assez élevée en carbonates tout le long du profil du sol.

Ces méthodes d'analyses du profil du sol sont détaillées dans le chapitre I de la troisième partie, correspondant au chapitre sur l'étude détaillée du profil du sol, intitulé « Propriétés du sol : approche pédologique ».

Cette partie est également composée d'un deuxième chapitre traitant d'outils d'investigation complémentaires. Ces outils visaient à confirmer l'approche pédologique présentée dans le premier chapitre. Des attaques totales acides ont été réalisées afin de les comparer avec les digestions à l'eau régale, ainsi que des mesures des rapports isotopiques du plomb. Enfin des techniques d'observation microscopiques du sol de surface ont été mises en œuvre, tout d'abord grâce à la microscopie électronique à balayage, couplée à une sonde analytique, puis grâce à une microsonde. Les méthodologies employées pour réaliser ces analyses sont présentées plus précisément dans le chapitre II de la troisième partie, intitulé « Autres méthodes d'investigation du plomb dans le sol ».

4 Expériences de culture sur sol contaminé

4.1 Choix des espèces végétales

4.1.1 La fève

La fève, *Vicia faba* est choisie comme première espèce végétale. C'est une plante supérieure dicotylédone, de la famille des Fabaceae (légumineuses). Nous utiliserons le cultivar Primabel de type "aguadulce" à longue cosse (longueur moyenne 25 cm), contenant 7 à 8 graines (Figure 14).

Cette plante a déjà fait l'objet d'expérimentations dans la littérature et elle est recommandée par la norme AFNOR NF T 90-327 pour l'évaluation de la génotoxicité, du fait de sa grande sensibilité vis-à-vis des micropolluants et de sa facilité d'obtention. Par exemple, elle a déjà été utilisée pour étudier les effets mutagènes des micropolluants rencontrés dans l'environnement. C'est un bon indicateur car elle est très sensible avec de courtes périodes de traitement. Elle est donc actuellement utilisée comme plante sentinelle. Par ailleurs, les tests sur les plantes sont simples. Les cellules et les chromosomes sont de grande taille, on peut donc facilement repérer les dommages. Après coloration des cellules et examen sous microscope, les défauts de structure sont facilement détectés (Chenon, 2001).



Figure 14: Gousse, tiges, feuilles et fleurs de *Vicia faba*

4.1.2 La tomate

La tomate, *Lycopersicon esculentum*, est le fruit d'une plante originaire des Andes, du Mexique et d'Amérique centrale (Figure 15). Elle appartient à la famille des Solanaceae, qui sont des dicotylédones. Comme les plantes de cette famille, les parois cellulaires principales de la tomate sont constituées d'approximativement 30% de pectine (Carpita et Gibeau, 1993) et possèdent une forte capacité de sorption. Lors de ces travaux, nous utiliserons le cultivar Rondello.

C'est une espèce sensible aux contaminations métalliques (Chatterjee et Chatterjee, 2003) et elle est connue pour employer des mécanismes de détoxification dans les feuilles (Lichtenberger et Neumann, 1997). Le plomb, le cuivre et le zinc seraient chélatés dans la plante par des acides

organiques de faible poids moléculaire comme la cystéine, un acide aminé soufré, grâce à des liaisons S-H (Léopold et al, 1999).



Figure 15 : Plans et fruits de tomates

4.2 Dispositif de culture employé

L'acquisition des éléments minéraux par les plantes dépasse le seul processus d'absorption par les racines (transfert depuis le sol vers la racine) en mettant en jeu de multiples processus chimiques et biologiques dans la rhizosphère, c'est à dire le sol situé au contact immédiat des racines. Pour essayer de comprendre ces processus majeurs de la nutrition minérale des végétaux, les recherches se sont souvent appuyées sur des dispositifs de culture en conditions contrôlées qui permettent de s'affranchir plus ou moins de la complexité de l'environnement naturel des végétaux. En particulier, de nombreux travaux ont été réalisés à l'aide de cultures en hydroponie (sur solution nutritive) bien adaptées à une utilisation en routine. De telles cultures permettent de réduire l'environnement des racines à sa plus simple expression : une solution nutritive de composition connue et maîtrisée qui permet d'étudier le processus d'absorption des éléments minéraux. Il n'est cependant pas possible d'appréhender les multiples autres processus mis en jeu au niveau de la rhizosphère, qui reposent sur des interactions entre les racines, le sol et la microflore qu'il renferme.

Pour étudier ces processus, nous avons recouru à un dispositif de culture permettant un accès facile aux racines et au sol situé à leur contact immédiat (Figure 16). C'est un dispositif de culture développé par P. Hinsinger au sein de l'UMR rhizosphère et symbiose de l'INRA de Montpellier. Il est adapté d'un dispositif de Guivarch et al. (1999), dérivant lui-même d'un dispositif de Niebes et al. (1993). Il est fondé sur l'obtention d'un tapis de racines qui est ensuite placé au contact du sol uniquement par sa face inférieure, au travers d'une toile à bluter (en polyamide) qui empêche la pénétration des racines dans le sol et évite les problèmes liés à l'adhérence de particules de sol aux racines. Ainsi, les racines ont l'avantage de pouvoir être aisément séparées physiquement du sol. Cela permet des manipulations au niveau des racines et également au niveau du sol. Ce sol étudié peut être considéré comme du sol rhizosphérique, car seule une très fine couche de sol est utilisée dans ce type de culture. Ce dispositif permet donc d'évaluer les changements dans la spéciation des métaux induits par les racines au niveau de la rhizosphère.

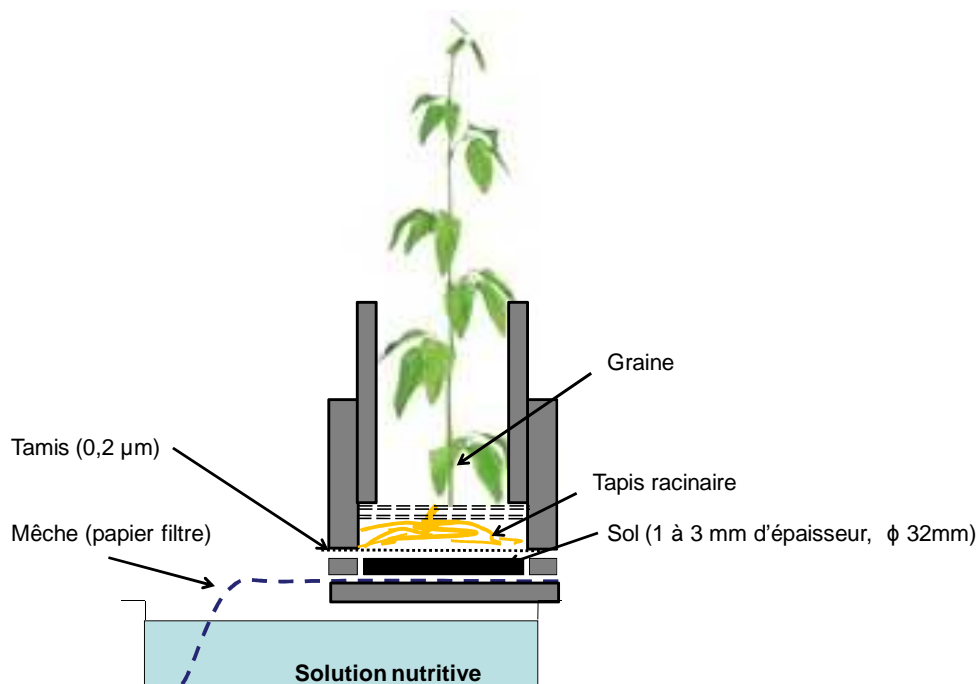


Figure 16 : Schéma de présentation du dispositif de microculture utilisé

Une présentation plus détaillée de ce dispositif se trouve dans le chapitre 4 : « Variation du pH au sein de la rhizosphère, transfert et spéciation du plomb ».

4.3 Minéralisation des végétaux et dosages du plomb

Après récolte des différents organes des végétaux, les masses fraîches et les masses sèches (après séchage à 80°C pendant 48h) sont déterminées, afin d'évaluer la teneur en eau de la plante. Les plantes sont ensuite réduites en poudre très fine au moyen d'un broyeur à bille avant minéralisation acide. Pour cela, 0,125 g de matériel végétal broyé et bien sec sont mélangés avec 5 mL d'acide nitrique à 65% puis placés dans un minéralisateur *DigiPREP Jr SCP Sciences* (Figure 17).



Figure 17 : Photographie de la plaque de minéralisation et des tubes à minéraliser utilisés pour les échantillons de végétaux.

Cet appareil de digestion est équipé d'une sonde de température, placée dans un tube de référence, permettant de travailler à une température adaptée au point d'ébullition du mélange de digestion. Les échantillons sont chauffés à 80°C pendant 1h (après un temps de chauffe de 30 min). Après refroidissement, on ajoute 5 mL de peroxyde d'hydrogène 30 volumes, puis les échantillons sont à nouveau chauffés pendant 180min à 80°C. Après refroidissement complet les échantillons sont filtrés, dilués de façon à ce que la teneur en acide soit inférieure à 10%, pour pouvoir être analysés par ICP-OES. La qualité des résultats a été validée grâce à l'utilisation d'un matériau de référence (feuilles de tabac Virginia, CTA-VTL-2, ICHTJ).

PARTIE III :

Comportement du plomb

le long du profil du sol

Dans cette partie, un premier chapitre est composé d'une publication sous presse dans la revue *Geoderma*, intitulée :

Multi-metal contamination of a calcic Cambisol by fallout from a lead recycling plant.

M. Cecchi, C. Dumat, A. Alric, R. Bidegain, P. Pradere and M. Guiresse

Des méthodes d'investigation supplémentaires sont ensuite présentées dans un second chapitre. Elles comprennent des dosages de plomb après attaque totale à l'acide fluorhydrique ainsi que des mesures des isotopes du plomb le long du profil. Ensuite des observations du sol de surface ont été réalisées grâce à un MEB couplé à une sonde EDS, ainsi qu'à une microsonde.

Chapitre I Approche pédologique

1 Introduction

Nous avons vu que le plomb était un élément trace métallique qui représentait un problème environnemental majeur. En effet, ses nombreuses utilisations ont entraîné une dispersion importante dans l'environnement, en particulier dans les sols. C'est un élément persistant, qui est toxique pour les écosystèmes, en particulier pour l'homme.

Dans les sols, ce n'est pas la concentration totale en plomb qui est la plus représentative de sa toxicité potentielle, mais plutôt son association avec les différents constituants du sol et sa spéciation chimique. En effet, dans les sols, les métaux sont associés avec les constituants du sol, selon leur origine et leurs interactions avec les différentes surfaces réactives des constituants du sol (Ure et al, 1995). Ils peuvent donc exister sous différentes formes physico-chimiques : ion simples ou complexes dans la solution du sol, ions échangeables, métaux associés à la fraction organique du sol, co-précipités avec les oxydes de fer et de manganèse, avec les carbonates ou les phosphates. Parmi ces différentes phases géochimiques, les ions présents dans la solution du sol ou les ions échangeables sont ceux qui ont des effets majeurs sur la toxicité du métal (Battaglia et al, 2007).

Dans ce contexte d'évaluation des risques, le premier objectif de ce travail de thèse était d'étudier le profil du sol voisin de l'usine de recyclage du plomb de la STCM, en activité depuis une quarantaine d'années. Pour cela, une étude pédologique globale a été réalisée, afin d'étudier et de comprendre le comportement du plomb (et des autres éléments traces métalliques) au sein de ce profil de sol. Les propriétés physiques (texture, granulométrie, minéralogie) et chimiques (pH, CEC, teneur en matière organique, carbonates, phosphates), ainsi que les concentrations pseudo-totales en élément majeurs et trace ont été déterminés. Ensuite, des extractions séquentielles ont été réalisées, en suivant une procédure en 7 étapes, développée par Leleyter et Probst (1998). Elles permettront d'étudier la répartition du plomb sur les différentes phases porteuses du sol. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article qui suit, accepté pour publication dans la revue *Geoderma*. Un résumé en français est présenté en page 78. Ces résultats ont également été présentés sous la forme d'un poster au congrès international de science du sol (18th World Congress of Soil Science, July 10th-14th 2006, Philadelphia, USA). Le résumé et le poster sont présentés en Annexe 1.

2 Présentation des principales analyses

2.1 Approche pédologique

Les propriétés physico-chimiques du sol ont été déterminées au laboratoire du LARA Europe Analyses. Elles concernent le pH, la CEC, l'analyse granulométrique, le dosage des teneurs en carbonates, en P_2O_5 (phosphore assimilable), matières organiques.

L'analyse minéralogique ainsi que les observations au microscope électronique à balayage couplé à la microsonde ont quant à elles été réalisées au le Laboratoire des mécanismes de Transferts en Géochimie (LMTG) de Toulouse.

2.2 Eau régale

Pour la détermination des teneurs pseudo-totales en éléments majeurs (Al, Fe, Mn, Mg) et traces (Pb, Cd, Cu, Zn, As, Cr, Ni), la méthode de minéralisation à l'eau régale est choisie car ce protocole de minéralisation normalisé (NF ISO 11466) (AFNOR, 1999), autorise des prises d'essais importantes, ce qui limite les problèmes de représentativité de l'échantillon. De plus, c'est un protocole d'analyses qui est largement utilisé pour des mesures de concentrations en éléments dans les sols, ce qui facilite les comparaisons.

Pour chaque échantillon, entre 0,2 et 3g de sol tamisé à 200µm sont mis en contact pendant une nuit à température ambiante avec un mélange d'acide chlorhydrique (HCl, 21ml) et d'acide nitrique (HNO₃, 7ml). Puis après une élévation progressive de la température, le mélange est porté à ébullition à 160°C pendant 2h. Toute la minéralisation est réalisée sous réfrigérant à reflux. Après refroidissement, la suspension est filtrée et le filtrat est recueilli dans une fiole jaugée de 100ml. Un rinçage du réfrigérant, du tube de minéralisation ainsi que du résidu solide sur le filtre avec HNO₃ 0,5M est ajouté au premier filtrat.

Les filtrats ainsi obtenus sont dilués au 1/10 pour le dosage des éléments majeurs et au 1/2,5 pour le dosage des éléments traces. Tous les échantillons sont dosés par ICP-OES (plasma inductible couplé à un spectromètre d'émission optique).

Un échantillon de référence 141R, pour lequel les concentrations en éléments traces sont certifiées est également analysé. Ce dernier permet également de vérifier la qualité de nos analyses des éléments majeurs.

2.3 Extractions séquentielles

Il existe de nombreuses méthodes d'extractions séquentielles, basées sur celle mise au point par Tessier et al (1979), puis largement modifiée. Nous avons vu précédemment que la méthode choisie pour ces travaux était la méthode mise au point par Leleyter et Probst (1998), qui compte 7 étapes successives et qui est caractérisée par un gradient décroissant de pH de manière à extraire les formes de plomb de moins en moins solubles (Figure 18).

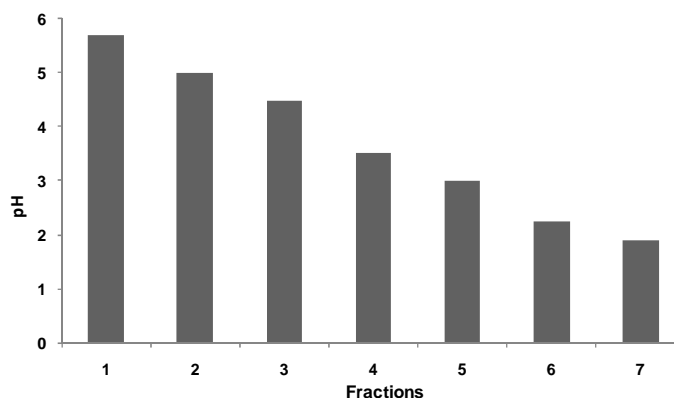


Figure 18 : gradient décroissant de pH au long de la procédure d'extraction séquentielle utilisée avec (1) fraction hydrosoluble ; (2) fraction échangeable ; (3) fraction liée aux carbonates ; (4) fraction liée aux oxydes de manganèse ; (5) fraction liée aux oxydes de fer amorphes ; (6) fraction liée aux oxydes de fer cristallins ; (7) fraction liée à la matière organique.

Après chaque réaction, la phase solide est séparée de la phase liquide par filtration, puis le volume de lessivât est quantifié par pesée. Puis avant de subir l'étape suivante de lessivage, le résidu est séché à 40°C dans une étuve pour éviter toute dissolution du solvant et tout développement bactériologique. Pour vérifier la qualité des extractions, des blancs sont réalisés et analysés pour chaque série d'extraction.

2.3.1 Phase soluble à l'eau (Pb Eau)

Cette extraction nous permet d'obtenir la fraction du plomb qui est soluble dans l'eau dans chaque échantillon. C'est la fraction potentiellement la plus mobile et la plus toxique.

1 gramme d'échantillon séché et broyé à 200µm est mélangé à 20ml d'eau désionisée Ultra Haute Qualité (UHQ) dans une bombe étanche en téflon. La réaction dure 30 minutes sous agitation constante, à température ambiante. La solution est filtrée puis le résidu est rincé avec 10ml d'eau UHQ avant d'être placé dans une étuve à 40°C pour séchage.

2.3.2 Extraction au Nitrate de Magnésium (Pb NMg)

Le but de cette étape est d'extraire les métaux adsorbés de façon non spécifique sur les particules, particulièrement ceux retenus à la surface du sol par des liaisons électrostatiques faibles. Elle est facilement remobilisable par un échange d'ion introduit de façon largement excédentaire dans la solution, comme une racine de plantes par exemple.

Le résidu de la fraction précédente est mélangé avec 5ml d'une solution de nitrate de Magnésium $Mg(NO_3)_2$ 1M pH 5 et est maintenu 2 heures sous agitation constante, à température ambiante. La solution est filtrée avec 10ml d'eau UHQ. Un deuxième ajout de $Mg(NO_3)_2$ 1M pH 5 est nécessaire pour désorber la totalité des cations échangeables. Le résidu et le filtre sont alors rincés une deuxième fois avec 10ml. Après filtration de la solution, le résidu est placé à l'étuve à 40°C pour séchage.

Cette fraction plus la précédente sont celles susceptibles de pouvoir rentrer dans la chaîne alimentaire relativement facilement c'est-à-dire dans les conditions physico-chimiques présentes actuellement dans le sol. Les autres, par contre, doivent être soumises à de très fortes variations de pH ou de potentiel d'oxydo-réduction pour être solubilisées.

2.3.3 Extraction à l'Acétate de Sodium (Pb AS)

Elle permet d'extraire la fraction dite acido-soluble : associée aux carbonates. Les carbonates sont présents dans les sols sous différentes formes, et les éléments traces peuvent co-précipiter avec les carbonates. La fraction liée aux phosphates est probablement extraite en même temps.

Le résidu de la fraction précédente est mélangé avec 10 ml d'une solution d'acétate de sodium 1M, ajustée à pH 4 grâce à de l'acide acétique. Cette réaction dure 5 heures, sous agitation constante, à température ambiante. La solution est filtrée et le résidu est rincé avec 20 ml d'eau UHQ et placé à l'étuve.

2.3.4 Extraction au Chlorure d'Hydroxylamine (Pb CH)

Elle permet d'extraire la fraction liée aux oxydes de manganèse. C'est la première étape de destruction de la fraction réductible qui comprend les oxydes de manganèse, les oxydes de fer amorphes et les oxydes de fer cristallisés.

Le résidu de la fraction précédente est mélangé avec 10 ml d'une solution de chlorure d'hydroxylamine 0,1M. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 30 minutes, à température ambiante. La solution est filtrée et le résidu est rincé avec 20 ml d'eau UHQ et mis à sécher à l'étuve.

2.3.5 Extraction à l'Oxalate d'Ammonium et Acide Oxalique (Pb OA)

C'est la deuxième étape de destruction de la fraction réductible. Elle correspond à l'extraction de la phase liée aux oxydes de fer amorphes. Dans cette étape, le pouvoir de dissolution de l'acide oxalique est combiné au pouvoir de solubilisation de l'oxalate d'ammonium, un ligand chélatant.

Le résidu de la fraction précédente est mélangé avec 10 ml d'une solution d'oxalate d'ammonium 0,2M + acide oxalique 0,2M à pH 3. La réaction dure 4h, sous agitation et à l'obscurité (car la lumière catalyse l'oxydation), à température ambiante. La solution est filtrée et le résidu est rincé avec 20 ml d'eau UHQ et mis à sécher à l'étuve.

2.3.6 Extraction à l'Oxalate d'Ammonium, Acide Oxalique et Acide Ascorbique (Pb OAAA)

Cette étape permet la destruction de la fraction réductible correspondant à la solubilisation des oxydes de fer cristallins. Pour améliorer la capacité de dissolution des oxydes de fer, un puissant réducteur, l'acide ascorbique, est ajouté au mélange précédent.

Le résidu de la fraction précédente est mélangé avec 10 ml d'une solution d'oxalate d'ammonium 0,2M + acide oxalique 0,2M + acide ascorbique 0,1M à pH 2,25. La réaction dure 30

min, sous agitation et chauffage à 85°C. Une fois refroidie, la solution est filtrée et le résidu est rincé avec 20 ml d'eau UHQ et mis à sécher à l'étuve.

2.3.7 Extraction à l'acide nitrique (HNO_3) et eau oxygénée (H_2O_2) (Pb AA)

Elle permet de mettre en solution des éléments associés aux composés oxydables (essentiellement matière organique et sulfures).

Le résidu de la fraction précédente est mélangé avec 8ml d' HNO_3 0,02M et 3ml d' H_2O_2 35%. La solution est maintenue sous agitation constante pendant 5h à 85°C. Après refroidissement, on rajoute 5ml d'acétate d'ammonium 3,2M préparé dans HNO_3 20%. Ceci permet d'empêcher l'absorption des métaux extraits sur le sol oxydé. On dilue alors l'échantillon avec 15ml d'eau UHQ et on agite le tout pendant 30 minutes supplémentaires. La solution est filtrée et le résidu est rincé avec 20 ml d'eau UHQ et mis à sécher à l'étuve.

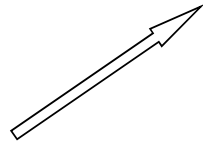
2.3.8 Fraction résiduelle

Dans cette étude, la fraction résiduelle n'a pas été extraite car elle concerne les formes de plomb très peu solubles car intégrées au sein des réseaux cristallins des silicates.

2.4 Dosage

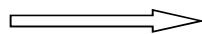
Ensuite les concentrations en éléments majeurs et traces sont déterminées dans toutes les phases de chaque échantillon par ICP-OES (plasma inductible couplé à un spectromètre d'émission optique).

3 Méthodologie générale employée dans ce chapitre



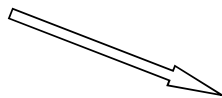
Analyses pédologiques classiques

pH, CEC, granulométrie, matière organique, carbonates...



Digestion à l'eau régale

Détermination des teneurs en éléments majeurs (Al, Ca, Fe, Mn) et trace (As, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb, Sn, Zn)



Extractions chimiques séquentielles

Détermination de la spéciation chimique au sens large, en particulier de la fraction disponible

Compréhension du comportement du plomb le long du profil du sol contaminé

4 Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead recycling plant

M. Cecchi⁽¹⁾, C. Dumat⁽¹⁾, A. Alric⁽¹⁾, R. Bidegain⁽²⁾, P. Pradere⁽³⁾ and M. Guiresse^{(1)*1}

(1) Laboratoire EcoLab. UMR. 5245 (CNRS-INP-ENSAT-UPS). 1 Av de l'Agrobiopole. BP 32607
Auzeville-Tolosane. 31326 Castanet-Tolosan. France.

(2) Lara Europe Analyses 1 impasse de Lisieux, B.P. 82553, 31025 Toulouse Cedex 3.

(3) STCM 11 route de Pithiviers. 45480 Bazoches-les-Gallérandes. France.

Abstract

The present study deals with the impact of a lead recycling plant on metal accumulation in soils, evaluated by a global pedological analysis. This general approach can be used on various contaminated sites to evaluate impact of an anthropogenic activity and inform on metal origin and behavior. A soil profile collected in the vicinity of a lead recycling plant in operation for 40 years was studied. Correlations between major and trace elements highlighted different patterns of metals according to their origins. Two groups of metals were identified: (i) Pb, Sb, Sn, As, Cu and Zn of anthropogenic origin and (ii) Ni and Cr of natural origin. The results showed that Pb, Sb and Sn presented the highest relative contamination followed by Cu, As and Zn. Moreover, Pb and Sb migrated most along the profile at an estimated rate of 1.5 cm y^{-1} , followed by Sn, then Zn, Cu and finally As. Sequential extractions showed that all metals were mainly solubilized by reduction and therefore estimated to be bound to iron oxides, except lead which was rather in the acid-soluble fraction in the contaminated horizons. Furthermore, high levels of lead were found in water-soluble and exchangeable fractions (4.2 mg kg^{-1}) suggesting the occurrence of lead transfer towards the trophic chain.

Key words: trace elements distribution, sequential extraction, soil profile, metal binding minerals, risk assessment

¹ Corresponding author.

Tel: +33-5-62-19-39-37; Fax: +33-5-62-19-39-01

Email adress : guiresse@ensat.fr

Résumé

Cette étude traite de l'impact d'une usine de recyclage du plomb sur l'accumulation de métaux dans le sol, évaluée grâce à une analyse pédologique globale. Cette approche générale peut être mise en œuvre sur différents sites contaminés pour évaluer l'impact des activités anthropiques, mais également de renseigner sur l'origine et le comportement des métaux.

Un profil de sol collecté dans l'enceinte d'une usine de recyclage du plomb, en activité depuis 40 ans a été étudié. Des corrélations entre les éléments majeurs et les éléments traces ont permis de distinguer différents comportements des métaux selon leur origine. Deux groupes de métaux ont pu être identifiés : (i) Pb, Sb, Sn, As, Cu et Zn, d'origine anthropique, et (ii) Ni et Cr d'origine naturelle. Les résultats ont montré que Pb, Sb et Sn présentaient les contaminations relatives les plus élevées, suivis de Cu, As puis Zn. De plus, Pb et Sb sont les métaux ayant le plus migré le long du profil, avec une vitesse de migration de 1.5 cm. an⁻¹, suivis de Sn, Zn, Cu et enfin As. Les extractions séquentielles ont montré que les métaux étaient majoritairement extraits dans la fraction réductible, et donc supposés être liés aux oxydes de fer, sauf pour le plomb, qui, dans les horizons contaminés, était préférentiellement dans la fraction acido-soluble. De plus, des niveaux élevés de plomb ont été mesurés dans les fractions hydrosoluble et échangeable, suggérant un possible transfert vers la chaîne trophique.

4.1 Introduction and context

Lead is a potentially toxic metal that occurs naturally in soils (its natural occurrence is related to the composition of the bedrock), in concentrations ranging from 1 to 200 mg Pb kg⁻¹ soil with a mean of 15 mg kg⁻¹ (Alloway, 1995; Baize, 2002). Lead can also enter the soil through numerous anthropogenic activities: the metallurgical industry, mining and smelting, electroplating, vehicle exhaust, energy and fuel production, soil fertilization and pesticide applications (Dumat et al., 2001; Alkorta et al., 2004). Indeed, lead owes the development of its uses to its physico-chemical characteristics (low melting point, resistance to acids and corrosion, absorption of radiation). Due to its persistence and numerous uses, lead is therefore one of the most common pollutants in the environment. It can enter the human food chain via contaminated meat or water, crops grown on contaminated soils and also direct incidental ingestion of contaminated soil particles by young children (Alloway, 1995). This poses a major environmental problem because lead uptake can cause negative effects on human health like irreversible disorders of the nervous, digestive and reproductive systems, or anaemias (Ahamed and Siddiqui, 2007). Indeed, lead is potentially toxic to many living organisms even at low concentrations. Risk to humans occurs at above 400-500 mg Pb kg⁻¹ soil (US EPA, 2001). That is why lead is a major focus for research.

Although the utilizations of lead are becoming increasingly limited, its electrochemical properties make it highly suitable for manufacturing batteries, which is one of the main current use of lead. Indeed, batteries represent 70% of the raw material for the recycling of lead, 160 000 tons being treated in France per annum. The recycling process is carried out in several stages (crushing, fusion, reduction and refining), each generating undesirable by-products such as Cu, Zn, As, Sb, Sn, Bi and Ag. This is why soils close to this kind of plant could present multi-metal contamination.

The first objective of the present study was therefore to assess the global impact on soil of lead-recycling plants, essential in today's industrial context. To do so, a global pedological approach was used to assess the behavior of lead and other metals generated by the process, but also their speeds of migration. Many studies have already been conducted on surface polluted soils located in urban environments (Chirenje et al., 2004; Banat et al., 2005; Elless et al., 2006). But only few deal with the behaviour of lead along the soil profiles in the industrial setting of atmospheric fallout (Dumat et al., 2001). Indeed, the literature generally reports that lead accumulates in the surface soil horizon because of its low mobility and strong association to soil constituents. In the case of non-point source pollution, endogenous and exogenous lead can be assessed by determination of the isotopic ratio. Such analyses are very expensive and not necessary in the case of point source pollution, with very high abnormal lead concentrations in soils surrounding the pollution sources.

Our work is based on a calcic cambisol profile (FAO, 1998) collected within the grounds of a lead recycling plant which has been in operation since 1967 in Bazoches-les-Gallérandes (45, France). The global pedological approach first consisted in the determination of the pedo-physical-chemical characteristics (pH, cationic exchange capacity, organic matter, carbonates and phosphorus contents) and then of the metal concentrations along the soil profile. The relationship between trace

and major elements was completed by additional measurements like direct observation with SEM and chemical extractions.

The last objective was to estimate the availability and distribution of trace elements along the profile. Indeed, metals can interact with the soil constituents and thus exist in various solid phase fractions, which govern their mobility and bioavailability (Dumat et al., 1997, 2001). This distribution can be measured by selective sequential extraction (Tessier et al., 1979), based on the solubility of individual solid phase components by selective reagents (Han et al., 2003). A large number of sequential extraction procedures have been developed (Tessier et al., 1979; Quevauviller et al., 1996; Ure et al., 1995). They have been criticized: a lack of specificity of the reagents and reported problems with metal redistributions and readsorption during the extraction procedure have been seen as drawbacks to the procedure (Raksasataya et al., 1996; Schramel et al., 2000). But, some studies, showed that the degree of readsorption was less than expected and that it did not invalidate the sequential extraction results (Ho and Evans, 2000; Bacon et al., 2006). This study, concerning a calcareous contaminated soil, used a sequential chemical extraction procedure, as reported by Leleyter and Probst (1998), which has a specific step to determine the carbonate fraction.

4.2 Material and Methods

4.2.1 Pedological analyses

The global pedological analysis developed in this study began by the determination of soil characteristics along a profile sampled every 10 cm. The soil pH was measured in water using a 1:2.5 soil/solution ratio according to the standard ISO 10390 procedure. After removal of organic matter with H_2O_2 and soil dispersion with sodium hexametaphosphate, granulometric analysis was carried out by sieving (for sand), sedimentation and extraction with a Robinson pipette (for clay and silt). The size fractions obtained were then classified as clay ($< 2\mu\text{m}$), silt ($2\text{--}50\mu\text{m}$) and sand ($50\text{--}2000\mu\text{m}$). The cationic exchange capacity (CEC) was obtained by the Metson method (1 mol L^{-1} ammonium acetate, pH 7 and 1 mol L^{-1} NaCl). For determination of CaCO_3 , CO_2 released by addition of HCl was measured with a calcimeter. Available phosphorus was assayed with the Joret-Hebert method. Organic carbon was measured using the wet oxidation method. As the availability of metals is influenced by active minerals like clay, that present numerous adsorption sites for metals, clay mineralogy was obtained after dispersion (successive washings), decarbonatation with HCl and extraction after 4h of sedimentation and preparation of the sample on glass slides. The analysis was performed on i) normal, ii) ethylene glycol saturated iii) oriented samples heated to 500°C . X-ray analyses of these oriented samples were performed on a CPS 120 INEL.

Pseudo-total concentrations were determined by digesting 13 air-dried soil samples (taken at various depths) in hot aqua regia. Each sample was analyzed in triplicate. The aqua regia extraction was based on the procedure recommended by the International Standardisation Organisation (ISO 11466, 1995). Samples (3g) were placed in a 250 mL pyrex digestion tube. The pre-digestion step was first done at room temperature for 16 h with 28 mL of 37% HCl-70% HNO_3 (3:1) mixture for slow oxidation of soil organic matter. The suspension was then digested at 160°C (the temperature of the

reaction mixture was slowly raised) for 2 h with a reflux condenser. The suspension obtained was then filtered through an ashless Whatman filter, diluted to 100 mL with 0.5 mol L⁻¹ HNO₃ and stored in polyethylene bottles for analysis. The accuracy of major and trace element assay was verified by using a certified reference material 141R (BCR, Brussels). The metal concentrations were finally measured by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) IRIS Intrepid II XDL/ Thermo Electron Corporation. Samples are assayed 3 times, and the ICP gave the mean value. The same technique was also used for samples obtained from the chemical extractions described below. All concentrations are based on dry matter.

4.2.2 Complementary analyses

Additional analyses were performed to complete the pedological analyses. First, sequential chemical extractions were used to partially characterize the association of metals with soil components and to identify the fractions that are, or could further become, available. A 7-step sequential extraction procedure was performed, according to Leleyter and Probst (1998). Samples between 0 and 90 cm were submitted to the extraction procedure, 2 replicates for each sample. A 100 g aliquot of soil obtained by quartation was finely ground in an agate mortar and sieved through a 200 µm sieve, then 1g of soil was submitted to the sequential extraction procedure. Each chemical fraction was operationally defined as described in Table 1. All the extractions were conducted in 120 mL Savilex beakers. The solid phase was washed with 20 mL of deionised water and dried at 45°C before the next extraction step in order to prevent any dilution of reagent used in the following step. Metal and metalloid concentrations were measured in the leachate fraction. The first step concerns the elements dissolved with water. The second aims to leach the cations adsorbed onto permanent structural charges with magnesium nitrate. A mix of sodium acetate and acetic acid in the third step leads to the dissolution of the carbonated or acid-soluble fraction. Then, analysis of the reducible fraction is divided into 3 steps. The fourth, fifth and sixth steps of the protocol progressively reduce the reducible fraction. The manganese oxides are dissolved first by hydroxylammonium chloride. Then a mixture of ammonium oxalate and oxalic acid leads to the reduction of amorphous iron oxides. In order to reach crystalline iron oxide dissolution, reduction, acid and complexation (ligand) actions were combined by addition of ascorbic acid to the previous mixture. Finally, using hydrogen peroxide, nitric acid and ammonium acetate, the last step allows the oxidation of all the oxidisable fractions.

Step	Fraction	Extractant	Reaction time	Temperature
1	Dissolved with water	Water (10mL)	30 min	20°C
2	Really exchangeable	1M Magnesium nitrate pH 5 (10 mL)	2 hours	20°C
3	Bound to carbonates or acid-soluble fraction	1M Sodium acetate+ acetic acid until pH 4.5 (10mL)	5 hours	20°C
4	Bound to Mn oxides	0.1M Hydroxylammonium chloride pH 3.5 (10mL)	30 min	20°C
5	Bound to amorphous iron oxides	0.2M Ammonium oxalate + 0.2M Oxalic acid (10 mL)	4 hours	20°C
6	Bound to cristalline iron oxides	0.2M Ammonium oxalate + 0.2M Oxalic acid + Ascorbic acid (10 mL)	30 min	80°C
7	Bound to organic matter or oxidizable fraction	1) 35% Hydrogen peroxide (8mL)+ 0.02M Nitric acid (3mL) pH 2 2) 3.2M Ammonium acetate (5mL)	5 hours	85°C

Table 1: Protocol summary of the 7-step sequential extraction procedure (Leleyter and Probst, 1998)

Then, in order to observe the metals and their environments, the 0-10 cm soil horizon was studied using a Jeol LV JSM-6360 scanning electron microscope (SEM) and an energy dispersive spectrometer (EDS) for elemental analysis.

The inter-relationships between trace elements and major elements or soil characteristics (Al, Fe, Mn, Mg, pH, CEC, granulometry, carbonates, soil organic matter, $P_{\text{Joret-Hebert}}$) were performed using STATISTICA v 7.0. Only the best linear models were retained and presented. The results were then compared to sequential chemical extractions in order to identify the main phases to which metals and metalloid bind.

4.2.3 Study site

The method was used in an experimental site, located in the Paris basin, in the west of the Loiret (*département* N°45), 45 km from Orleans and 80 km south of Paris. The studied soil was sampled in February 2005 near a lead recycling plant surrounded by agricultural land with vegetable gardens located south of Bazoches les Gallérandes along secondary road N°927. Preliminary studies done by LARA Europe Analyses on this site showed a homogeneous distribution of lead around the plant, with decreasing concentrations as the distance from the factory increased. A pit was dug to 150 cm depth to determine the profile and the soil was sampled every 10 cm from the top soil down to 130

cm. The very topsoil, composed of fresh grass cover, was removed. A total of 13 samples were air dried in the laboratory at 25°C to constant weight and sieved through a 2 mm size AFNOR sieve, then homogenized and stored in paper bags.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Pedological and physical-chemical characteristics of the soil profile (table 2 and 3).

The first meter of soil is mainly composed of a Quaternary loess deposit on a Tertiary marl "Marnes de Blamont". Four horizons were mainly observed in the soil profile. The first is an A horizon from 0 to 25 cm, with a brown colour (Munsell: 7.5 YR 4/3) due to the organic matter, a very high porosity (50%) and an almost granular structure with a subangular polyhedral structure. The second is a cambic horizon from 25 to 90 cm, with a strong brown colour (7.5 YR 5/8) due to the presence of clay coming from phyllosilicates resulting from degradation of the loess. This horizon has a prismatic structure and its porosity decreases compared to the horizon above (15-20%). The third is a C horizon from 90 to 110 cm, it is an intermediate horizon of marl deterioration with a brownish yellow colour (10 YR 6/6). The last one is an R horizon or marl (bed rock), starting from 110 cm with a very pale brown color (10 YR 8/3). The main soil characteristics are presented in Table 2. The calcareous soil studied presents a very alkaline pH all along the profile (pH varies from 7.2 in top soil to 8.8 at depth). It presents very high carbonate levels at depth (93%) which quickly decrease as soon as the marl is degraded. From 85 cm to the surface, the carbonate levels remain below 2.5%.

Unlike carbonates, the proportion of clay minerals increases in the alterite horizon. Clays result from the deterioration of the silicates present in the marl and the loess and becomes very abundant in the cambic horizon (30 to 40%). About 95% of the clay minerals were recognized as illite. Illite is characterized by a basal reflection of 10Å, unchanged after glycolation and heating to 550°C. Then a very small amount of kaolinite was identified, characterized by a 7Å basal reflection (in an untreated and glycolated sample) which disappears after heating (figure 1).

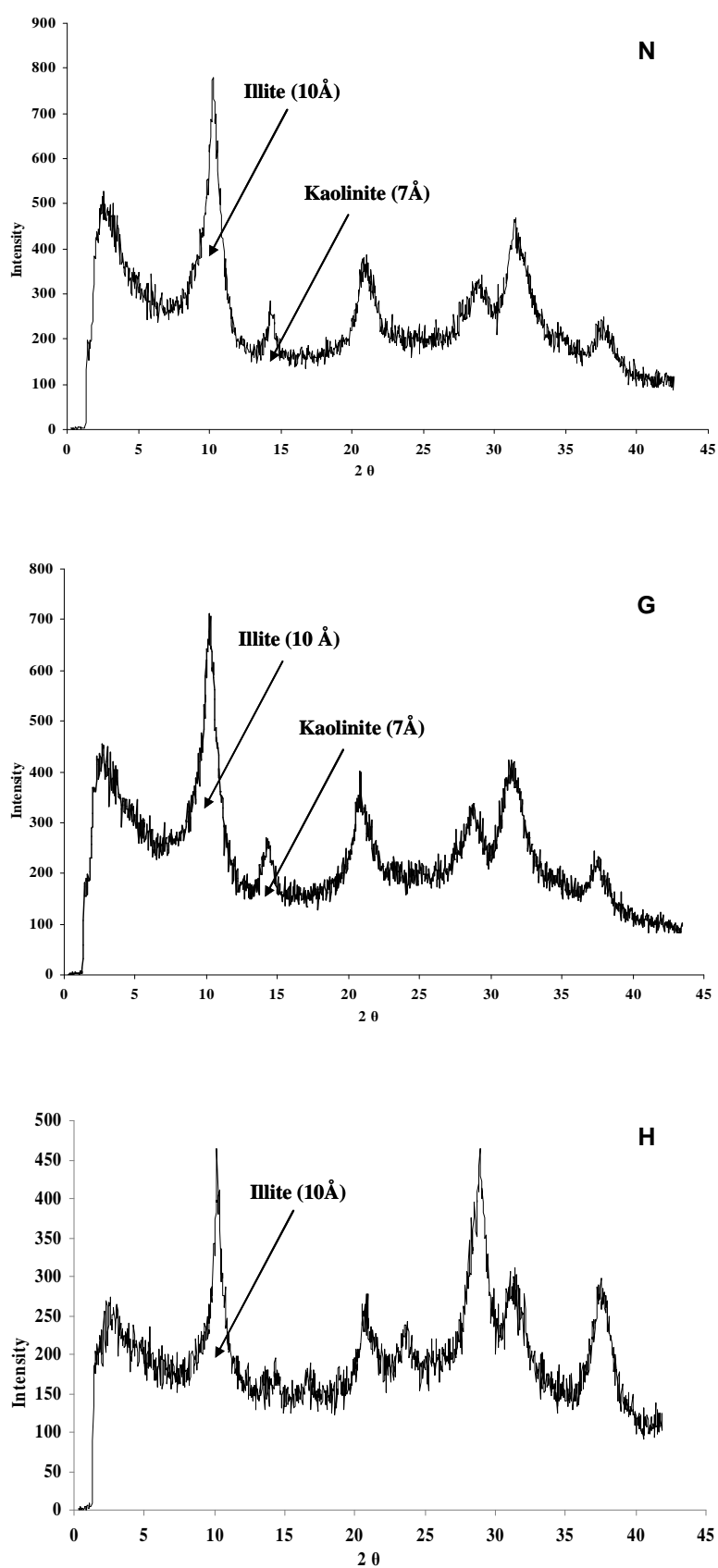


Figure 1: X-ray diffraction pattern of the 0-10 cm horizon soil sample showing the clay minerals. (N): normal sample, (G): glycolated sample and (H): heated sample

Soil organic matter (SOM) presents high concentrations in the epipedon (6%), certainly due to the presence of a lawn for nearly 60 years but perhaps also to the stabilization effect induced by the presence of large amounts of metals (Dumat et al., 2006). The SOM content generally decreased with depth, except a slight increase observed at 90 cm, that can be explained by (i) an accumulation of degraded roots which go down along the profile and remain blocked above the impenetrable calcareous horizon, (ii) dissolved organic carbon migration at high pH, or (iii) by a paleosol which is often found above the marl (BRGM, 1978).

These clay and SOM contents are associated with a cationic exchange capacity varying in the range of 7.4 to 23.2 cmol(+) kg⁻¹, following the granulometric clay profile ($r^2 = 0.92$). The CEC presents little variation along the whole profile. In the first 40 centimeters, it is explained by the strong SOM content. Then, this SOM level decreased and the CEC is explained by the high content of illite (which is a clay with a CEC between 10 and 40 cmol(+) kg⁻¹).

Available phosphorus is higher in the topsoil (88 mg P₂O₅ kg⁻¹) surely due to the contribution of phosphate-enriched fertilizers intensively added in the 70's. In-depth we find high levels of phosphorus from the calcium phosphates contained in the bed rock. These phosphates are undoubtedly rather soluble and disappear during deterioration of the marl (the P₂O₅ content decreases strongly in the S horizon). High clay and phosphates could be the major bearing phases for the lead in the surface horizons. In particular, the formation of the extremely stable lead phosphates, could reduce lead availability (Diyab et al., 2003).

The soil pseudo-total calcium concentrations along the profile (Table3) were in the range of 0.57 to 33.57% and follow the carbonate profile ($R^2 = 0.99$) since this soil contains calcium carbonates. Soil pseudo-total aluminium concentrations were between 0.88 and 4.13 % and follow the clay profile ($R^2=0.9$), indeed, aluminium is a component of clays which are aluminosilicates. For iron, manganese and magnesium they range between 0.52 - 3.29%, 0.02 - 0.09% and 0.30 - 0.56% respectively. These 3 metals follow the granulometric clay profile, but are subjected to the influence of soil organic matter in the topsoil. Indeed, below 30 cm, Fe, Mn and Mg have profiles parallel with those of clays and aluminium, because the metals are probably contained in the clays. These metals are thus well correlated with clays starting from 30cm. Between 0 and 30 cm, they are also present in the organic matter, that is why in these first centimeters, the concentrations in Fe, Mn and Mg are explained especially by the strong content of organic matter. Nevertheless, sequential extractions showed that 71 to 93% of Fe and 62 to 79% of Mn were contained in the 3 reducible fractions (steps 4, 5 and 6), which means that these metals are mainly in the form of oxide in this soil.

PARTIE III : Comportement du plomb le long du profil du sol

Depth(cm)	pH water	CEC cmol+.kg-1	Sand	Silt	Clay (%)	Carbonates	OM	P ₂ O ₅ mg.kg ⁻¹
0-10	7.70 ± 0.08	15.10 ± 1.97	21 ± 6.2	52.7 ± 6.0	20.38 ± 1.8	2.5 ± 1.2	5.98 ± 0.12	88 ± 19
10-20	7.83 ± 0.22	16.83 ± 0.88	14.6 ± 2.9	56.6 ± 2.8	25.6 ± 2.2	1.5 ± 0.24	3.24 ± 0.14	70 ± 18
20-30	8.05 ± 0.06	15.63 ± 2.46	14.9 ± 2.8	56.9 ± 2.1	26.0 ± 2.7	2.1 ± 1.2	2.29 ± 0.20	72 ± 25
30-40	8.08 ± 0.19	18.80 ± 0.50	6.4 ± 1.0	62.4 ± 0.96	30.8 ± 1.4	1.37 ± 0.28	1.45 ± 0.18	44 ± 17
40-50	8.23 ± 0.05	20.40 ± 0.50	7.5 ± 1.6	58.0 ± 0.8	33.4 ± 1.5	0.73 ± 0.30	1.1 ± 0.11	24 ± 14
50-60	8.18 ± 0.13	20.53 ± 1.14	5.2 ± 0.4	57.4 ± 0.5	36.6 ± 0.4	0.82 ± 0.41	0.90 ± 0.22	26 ± 15
60-70	8.28 ± 0.05	21.48 ± 1.74	11.6 ± 3.8	52.5 ± 2.5	35.2 ± 1.3	0.67 ± 0.40	0.72 ± 0.07	27 ± 18
70-80	8.25 ± 0.13	21.73 ± 2.56	15.0 ± 6.5	46.7 ± 3.7	37.8 ± 2.8	0.89 ± 0.63	0.54 ± 0.16	20 ± 12
80-90	8.33 ± 0.10	23.25 ± 2.65	27.7 ± 4.7	35.8 ± 2.6	35.7 ± 2.2	1.36 ± 0.72	0.87 ± 0.06	24 ± 15
90-100	8.53 ± 0.05	18.68 ± 0.88	27.2 ± 0.8	42.0 ± 0.7	29.6 ± 0.4	48.2 ± 2.60	1.29 ± 0.37	34 ± 18
100-110	8.63 ± 0.05	12.15 ± 0.93	34.6 ± 2.1	42.4 ± 1.5	22.3 ± 0.8	77.3 ± 3.9	0.85 ± 0.85	47 ± 15
110-120	8.83 ± 0.05	8.75 ± 0.17	36.9 ± 1.7	44.3 ± 1.9	18.4 ± 0.5	89.9 ± 3.0	0.41 ± 0.41	51 ± 16
120-130	8.83 ± 0.05	7.43 ± 0.28	37.2 ± 2.0	47.9 ± 1.4	14.8 ± 0.7	92.1 ± 2.5	0.13 ± 0.13	50 ± 14

Table 2: Physical and chemical properties of the soil profile

Depth (cm)	(%)						mg kg ⁻¹
	Al	Ca	Fe	Mg	Mn	Na	P
0-10	2.64 ± 0.08	1.22 ± 0.02	2.31 ± 0.06	0.39 ± 0.01	0.07 ± 0.001	0.29 ± 0.025	0.06 ± 0.001
10-20	2.65 ± 0.02	1.14 ± 0.01	2.45 ± 0.19	0.37 ± 0.01	0.07 ± 0.002	0.08 ± 0.014	0.05 ± 0.001
20-30	2.65 ± 0.05	1.05 ± 0.01	2.46 ± 0.03	0.37 ± 0.00	0.07 ± 0.001	0.05 ± 0.013	0.05 ± 0.001
30-40	2.84 ± 0.09	0.95 ± 0.01	2.40 ± 0.04	0.40 ± 0.02	0.07 ± 0.002	0.04 ± 0.008	0.03 ± 0.001
40-50	3.04 ± 0.03	0.65 ± 0.01	2.65 ± 0.04	0.44 ± 0.00	0.06 ± 0.001	0.03 ± 0.002	0.03 ± 0.001
50-60	3.13 ± 0.03	0.57 ± 0.01	2.73 ± 0.07	0.45 ± 0.01	0.06 ± 0.001	0.03 ± 0.001	0.03 ± 0.001
60-70	3.37 ± 0.07	0.63 ± 0.01	2.96 ± 0.06	0.48 ± 0.01	0.06 ± 0.001	0.03 ± 0.001	0.02 ± 0.000
70-80	3.68 ± 0.07	0.68 ± 0.01	3.18 ± 0.06	0.52 ± 0.01	0.07 ± 0.001	0.03 ± 0.001	0.02 ± 0.000
80-90	4.13 ± 0.08	1.09 ± 0.02	3.29 ± 0.07	0.56 ± 0.01	0.09 ± 0.002	0.04 ± 0.001	0.03 ± 0.001
90-100	2.28 ± 0.05	18.21 ± 0.36	1.77 ± 0.04	0.37 ± 0.01	0.05 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.02 ± 0.000
100-110	1.35 ± 0.03	28.84 ± 0.58	0.99 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.03 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.02 ± 0.000
110-120	0.92 ± 0.02	33.22 ± 0.66	0.58 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.02 ± 0.000	0.04 ± 0.001	0.01 ± 0.000
120-130	0.88 ± 0.02	33.57 ± 0.67	0.52 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.02 ± 0.000	0.05 ± 0.001	0.01 ± 0.000

Table 3: Major element concentrations versus depth obtained after aqua regia digestion

4.3.2 Solum trace element pattern

The pseudo-total concentrations of trace elements obtained from aqua regia digestion, versus depth are given in table 4. Two different behaviors for these trace elements in soils can be observed.

First, Ni and Cr levels were 7.5-41 mg kg⁻¹ and 14.5-92.7 mg kg⁻¹ respectively. These concentrations increased with depth along the profile to reach maximum values in the C horizon and are close to those found in the lithosphere. Indeed, according to Baize (2002) mean natural concentrations are around 50 mg kg⁻¹ for Cr and 40 mg kg⁻¹ for Ni.

By contrast, Pb, As, Cu, Sb, Sn and Zn peak in the upper part of the profile, and are significantly higher than in the R horizon. Lead concentration in the topsoil was 1932 mg kg⁻¹ and decreased rapidly with depth. Indeed, this concentration is already divided by 2.5 in the next sample (785 mg kg⁻¹ in the 10-20 cm horizon). From 50-60 cm, concentrations were low (around 40 mg kg⁻¹) and remained almost constant before reaching the marl. These concentrations are close to the background level, according to the work of Baize (2002) in a study in the same region. Indeed, he reports that in the limestone of the Beauce area, the common pedogeochemical background level of lead is estimated at 40 mg kg⁻¹, as found in the current work at 60 cm.

In the same way, Sb and Sn varied between 0 and 67.4 mg kg⁻¹ and 1.1 to 36.8 mg kg⁻¹ respectively from depth to the surface. These concentrations largely exceed the natural surface concentrations for these 2 metals. For Sb, background levels are between 0.2 and 10 mg kg⁻¹ (Baize, 2002). Moreover, a soil is considered as polluted starting from 30 mg kg⁻¹. For Sn, the natural content of the uncontaminated soil is approximately 5 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias and Pendias, 1992).

Depth (cm)	mg kg ⁻¹							
	As	Cr	Cu	Ni	Pb	Sb	Sn	Zn
0-10	28.08 ± 2.20	61.83 ± 1.03	34.23 ± 0.54	33.36 ± 1.75	1932.58 ± 7.40	67.38 ± 1.35	36.84 ± 0.74	86.90 ± 2.69
10-20	19.48 ± 0.39	65.46 ± 0.29	20.43 ± 0.95	28.66 ± 1.22	785.02 ± 1.54	34.14 ± 0.68	17.19 ± 0.34	68.28 ± 0.70
20-30	13.66 ± 0.91	64.97 ± 2.33	13.58 ± 0.92	30.40 ± 6.28	279.88 ± 8.19	11.16 ± 0.22	10.55 ± 0.21	70.77 ± 5.53
30-40	11.50 ± 0.00	69.77 ± 1.66	10.58 ± 0.26	26.08 ± 1.98	139.48 ± 8.29	4.36 ± 0.09	3.03 ± 0.06	61.78 ± 16.66
40-50	11.32 ± 0.19	74.88 ± 0.80	9.10 ± 0.06	27.08 ± 0.97	83.40 ± 1.46	2.30 ± 0.05	1.89 ± 0.04	52.39 ± 0.75
50-60	12.25 ± 0.19	81.23 ± 0.61	8.65 ± 0.02	29.35 ± 1.13	56.26 ± 0.78	0.93 ± 0.02	1.90 ± 0.04	54.81 ± 0.92
60-70	12.23 ± 0.24	83.24 ± 1.66	8.41 ± 0.17	30.86 ± 0.62	44.89 ± 0.90	0.40 ± 0.01	1.44 ± 0.03	55.23 ± 1.10
70-80	13.74 ± 0.27	90.51 ± 1.81	8.61 ± 0.17	35.84 ± 0.72	31.83 ± 0.64	0.00 ± 0.00	1.54 ± 0.03	61.38 ± 1.23
80-90	15.26 ± 0.31	92.67 ± 1.85	9.42 ± 0.19	40.79 ± 0.82	41.79 ± 0.84	0.39 ± 0.01	1.10 ± 0.02	61.64 ± 1.23
90-100	10.02 ± 0.20	48.49 ± 0.97	6.51 ± 0.13	20.40 ± 0.41	35.60 ± 0.71	0.87 ± 0.02	1.81 ± 0.04	30.49 ± 0.61
100-110	5.34 ± 0.11	26.83 ± 0.54	4.36 ± 0.09	12.22 ± 0.24	23.48 ± 0.47	0.83 ± 0.02	4.77 ± 0.10	16.46 ± 0.33
110-120	3.33 ± 0.07	15.92 ± 0.32	3.75 ± 0.07	7.43 ± 0.15	3.63 ± 0.07	0.00 ± 0.00	1.43 ± 0.03	8.57 ± 0.17
120-130	3.01 ± 0.06	14.54 ± 0.29	3.94 ± 0.08	8.04 ± 0.16	3.59 ± 0.07	0.11 ± 0.00	1.65 ± 0.03	7.96 ± 0.16

Table 4: Trace element concentrations versus depth obtained after aqua regia digestion

Finally, the profiles of As, Cu, and Zn are close to that of Pb, Sb and Sn, but at lower concentrations. Arsenic concentrations varied from 3 mg kg⁻¹ at depth to 28 mg kg⁻¹ in the topsoil which indicates contamination. Indeed, according to Alloway (1995), an unpolluted soil contains between 1 and 20 mg kg⁻¹. For Cu, concentrations ranged from 4 to 34 mg kg⁻¹ whereas those found in the tilled horizons of this area of Calcaires de Beauce lie between 11 and 20 mg kg⁻¹ (Baize, 2002). For Zn, concentrations ranged from 8 to 87 mg kg⁻¹: those at the pedo-geochemical bottom background of the agricultural soils of the plain of Beauce do not exceed 80 mg kg⁻¹ according to the same author.

The patterns of these trace elements in the solum indicate that the soil is contaminated by Pb, As, Cu, Sb, Sn and Zn in the upper horizons. Thus, we can note a very strong anthropogenic contribution for Pb, Sb and Sn. Concerning As, Cu and Zn, contamination exists, but is less marked. Indeed, during the process, lead-acid batteries are melted down and refined to purify the lead residue obtained. During this phase, several metals are eliminated including As, Cu, Sb and Sn. In fact, Zn is currently added during refining. This explains why, in addition to lead contamination, the soil contains abnormally high As, Cu, Zn, Sb and Sn levels.

4.3.3 Relations between trace metals and metalloids versus major elements

Studying the correlations between the soil characteristics and all the parameters presented in tables 1 and 2, iron was the element which best explains the distribution of metals and the metalloid along the soil profile. Such high affinity between iron and trace metals has been shown in previous pedological studies. Sparks (1995) proposed selectivity sequences for the adsorption or coprecipitation of divalent metal cations on various hydrous iron oxides. Gavalda (2001) and Cornu et al. (2005) found that iron oxides were between 2- and 17-fold more concentrated in trace metals than in bulk non-contaminated soils. Our results confirm that the relationship between iron oxides and trace elements can be used to detect anomalies in trace element patterns. These relations enabled us to distinguish 2 groups of metals. One group concerns elements for which concentrations obey the same laws all along the profile. Such elements were assumed not to present concentration anomalies. Another group concerns metals for which the relationships with major elements are strongly perturbed as we approach the surface. These elements were assumed to be enriched by the plant fallout.

4.3.3.1 Constant relation with iron along the profile: nickel and chromium

Among major elements, iron is the most correlated to nickel and chromium. Indeed, linear regression analysis was performed between Ni and Cr versus Fe (figure 2). Results showed that Ni and Cr are very well delineated by iron oxides, with a constant relationship all along the profile ($r^2 = 0.99$ for Cr with $n = 13$ and $p < 0.001$ and 0.93 for Ni with $n = 13$ and $p < 0.001$). Such a good linear correlation suggests a high affinity of Ni and Cr for Fe. These results are confirmed by sequential extractions performed on the soil samples. Indeed, they showed that 71-89% of Cr and 51-81% of Ni are contained in the 3 reducible fractions (step 4, 5 and 6). Data from linear regression analysis and sequential extractions combined with pseudo-total concentrations confirmed that these elements are

mainly derived from soil minerals, without the impact of industrial atmospheric input. Moreover, Cr and Ni results were strongly correlated confirming their common natural origin ($r^2 = 0.9$; $p < 0.001$; $n = 13$).

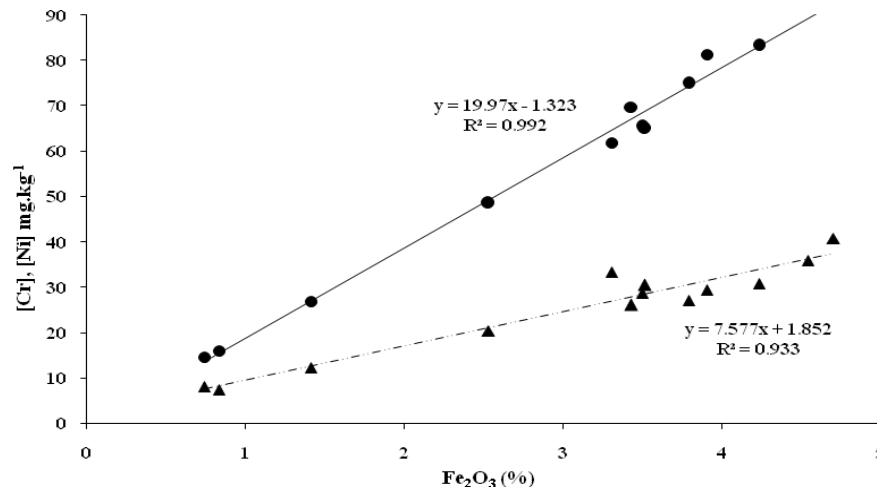


Figure 2: Correlation between soil pseudo-total Fe_2O_3 and Cr (●) or Ni (▲) concentrations

4.3.3.2 Relation with iron perturbed in surface

4.3.3.2.1 Lead

As already shown by other studies on contaminated soils (Ge et al., 2000; Dumat et al., 2001 and 2006; Ettler et al., 2005), our results highlight a high lead concentration in the topsoil, decreasing quickly with depth as seen in figure 3.

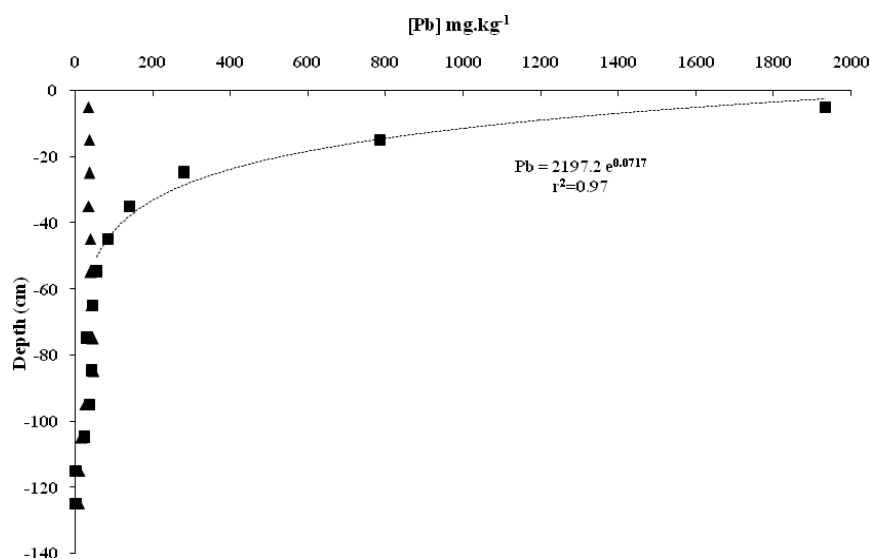


Figure3: Comparison between the soil pseudo-total lead concentrations obtained after aqua regia digestion (■) and those predicted by the linear regression analysis between Pb and Fe_2O_3 starting from 60cm (equation [1]) (▲)

Linear regression analysis performed between pseudo-total (aqua regia) [Pb] (mg kg^{-1}) and $[\text{Fe}_2\text{O}_3]$ (%) showed that, below 60cm depth, lead is mainly bound to iron oxides with the following equation:

$$[\text{Pb}] = 9.4883 \times [\text{Fe}_2\text{O}_3] + 2.9787 \quad (r^2 = 0.7141; n = 7; p = 0.0083) \quad (1)$$

These results combined with the pseudo-total concentrations at 60 cm depth (around 40 mg kg^{-1}) indicate that the background level is reached at this depth. In order to check that the unpolluted level was reached, relationships between Pb and Fe assessed on various solums by several authors (Gavalda, 2001; Navas and Machin, 2002; Velde et al. 2003; Tyler, 2004; Sipos et al., 2005; Lamy et al., 2006) were compared to our results (figure 4). All their data were collected in soil profiles without any point source pollution. In all cases, the Pb-Fe relationship was very close to the data we collected in our profile below 60 cm. This led us to conclude that below this depth contamination was negligible.

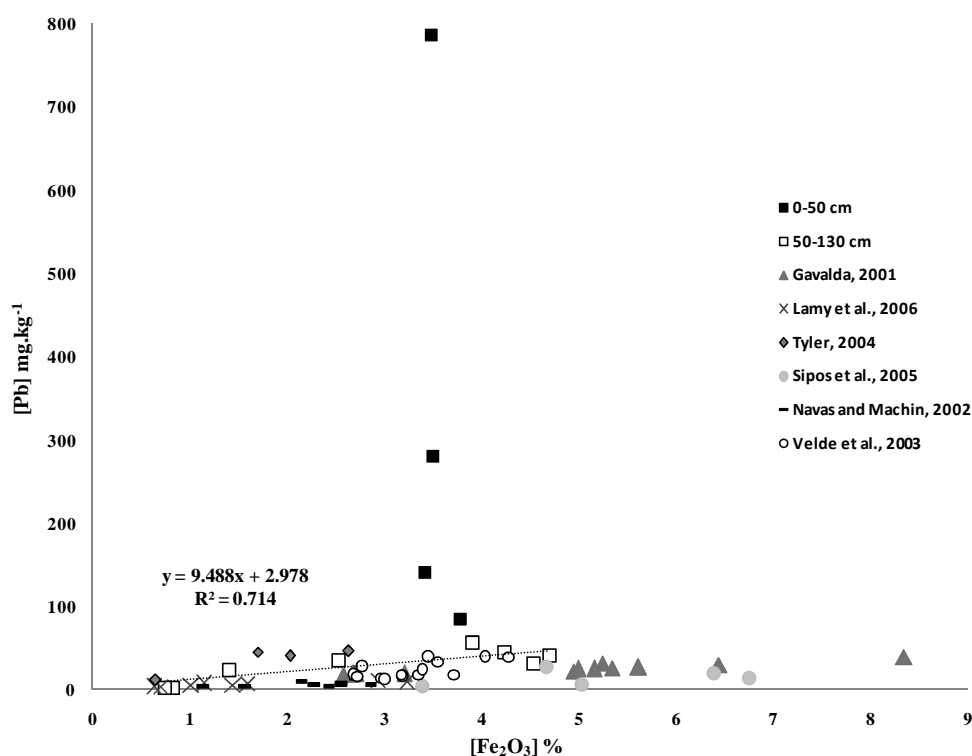


Figure 4: Correlations between soil pseudo-total Pb and iron oxide Fe_2O_3 concentrations between 0 and 50 cm (■) or 50 and 130 cm (□), compared with data collected on uncontaminated soils

Thus, in the soil studied, anthropogenic lead resulting from the plant's activity seems to have migrated down to 60 cm, below this depth, the background concentration is reached. The plant being in activity since 1967, lead crossed approximately 60 cm in 40 years. The speed of migration of lead can therefore be estimated at 1.5 cm per year. The equation obtained during the analysis by linear regression between the lead and the iron oxides below 60 cm was used to predict the concentrations

on the surface in the absence of anthropogenic contamination. The results reported in figure 3 clearly show that the concentrations actually obtained diverge strongly from those extrapolated from the values at 60 cm, indicating contamination at this depth.

In the first 60 cm, the Pb concentrations were 2-40 fold higher than the natural background, and largely exceeding the critical soil concentrations defined by Kabata-Pendias and Pendias (1992). Indeed, they consider that above 400 mg kg^{-1} Pb in a soil, toxicity is possible. Thus, in this soil, the strong anthropogenic contamination and the possible vertical mobility of Pb along the profile may be considered. Linear regression analysis performed in the first 60cm, indicated that anthropogenic lead is strongly influenced by soil organic matter ($r^2=0.96$). These results are in agreement with those obtained in a similar context of industrial contamination by Dumat et al. (2001 and 2006) and Diyab et al. (2003).

The topsoil clearly contained elevated levels of lead, the sequential extractions gave an indication of its distribution in various soil pools and of their potential for mobilization into the aqueous phase. The chemical extraction results are summarized in table 5.

Between 0 and 50 cm lead is mainly found in the acid-soluble fraction (step 3) over a range of 40 to 60%. Therefore, we can estimate that lead is mainly bound to carbonates and phosphates because the sodium acetate treatment can dissolve both these compounds. In the first 50 cm, the remainder of the lead was contained mainly in the iron oxides (steps 5 and 6) (20-50%) and then in organic matter (step 7). Although direct comparison is not possible because of the different extraction methods used, this is in apparent agreement with a study by Clemente et al (2006), in calcareous soil from a former Pb-Zn mine area heavily contaminated by lead (1572 mg kg^{-1}), indeed, they found 42% of the lead in the same acid-soluble fraction. In a study by Kabala and Singh (2001), the surface horizon of a highly contaminated soil was found to contain up to 45% carbonate-bound Pb. The geochemical Pb^{2+} characteristics allow lead to bind to carbonates in calcareous soils where the metals are precipitated or co-precipitated depending on pH (Dang et al., 2002). In addition, as shown in this work, Kabata-Pendias and Pendias (1992) and Dumat et al. (2001) found accumulation of lead in the organic fraction with relatively strong interactions. It is interpreted as the amount of metal that can be released in strong oxidizing conditions due to organic matter degradation (Tessier et al., 1979; Dumat et al., 1997; Ettler et al., 2005).

Then between 50 and 90 cm, the lead behavior differed, confirming the linear regression analysis. Indeed, lead was mainly found in the 3 reducible fractions (steps 4, 5, 6) (39 to 76%) and the remainder was divided between the acido-soluble and oxidisable fractions. Many authors have shown that lead has a preference for manganese or iron oxides. Indeed, according to Tessier et al. (1979); Dang et al. (2002) and Banat et al. (2005), Fe and Mn oxides are excellent scavengers for trace metals and they can be mobilized under reducing and acid conditions.

PARTIE III : Comportement du plomb le long du profil du sol

[Pb] mg.kg ⁻¹ soil																											
	Depth (cm)																										
	0-10			10-20			20-30			30-40			40-50			50-60			60-70			70-80			80-90		
1	1.10	±	0.28	0.16	±	0.15	0.00	±	0.00	0.01	±	0.02	0.01	±	0.020	0.01	±	0.003	0.00	±	0.00	0.08	±	0.02	0.01	±	0.004
2	3.08	±	0.98	0.25	±	0.30	0.00	±	0.00	0.06	±	0.12	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
3	963.81	±	36.48	341.52	±	24.30	96.89	±	4.31	48.02	±	1.18	30.68	±	1.365	12.55	±	0.56	4.59	±	0.20	8.23	±	0.37	9.10	±	0.41
4	6.09	±	1.66	2.80	±	0.32	1.24	±	0.005	0.40	±	0.04	0.28	±	0.004	0.20	±	0.03	0.22	±	0.04	0.14	±	0.02	0.13	±	0.02
5	173.33	±	44.61	94.25	±	0.69	47.57	±	6.42	25.97	±	3.66	34.69	±	4.683	18.52	±	2.50	16.76	±	2.26	12.36	±	1.67	6.39	±	0.86
6	139.00	±	6.72	75.67	±	3.57	35.67	±	2.14	19.58	±	1.61	10.55	±	0.633	7.47	±	0.45	6.61	±	0.40	5.61	±	0.34	6.10	±	0.37
7	370.48	±	4.53	147.69	±	18.87	58.85	±	2.94	25.37	±	0.04	2.82	±	0.141	3.50	±	0.17	2.85	±	0.14	1.84	±	0.09	11.02	±	0.55
Σ (fractions)	1656.89			662.34			240.23			119.41			79.03			42.25			31.03			28.26			32.77		
Aqua regia	1932.58			785.02			279.88			139.48			83.40			56.26			44.89			31.83			41.79		

Table 5: Distribution of lead in each fraction of the sequential extraction procedure with Step 1: extractible with H₂O; Step 2: exchangeable; Step 3: acid-soluble fraction; Step 4: bound to manganese oxides; Step 5: bound to amorphous iron oxides; Step 6: bound to crystalline iron oxides and Step 7: oxidizable fraction.

Thus, in our study, the oxide occluded fraction of Pb is not the dominant fraction in the contaminated horizons contrary to what has been reported by several authors (Ramos et al., 1994; Ahumada et al., 1999). This distribution suggests that there are insufficient iron oxides in the soil to bind all the lead or that the interaction between oxides and the other soil components (soil organic matter in particular) could modify their affinity for metals (Cheshire et al., 2000). Lead is then fixed on carbonates, which are present all along the soil profile at a constant value (around 2%) in the 90 first cm.

The water and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ exchangeable extractions (steps 1 and 2) performed on the top soil (0-10 cm horizon) represent a very small percentage (0.3%), meaning that the epipedon contains 4.2 mg kg^{-1} in these fractions. They are considered to be the most mobile and available phase present in the soil (Tessier et al., 1979; Banat et al., 2005). This underlines a potential risk of transfer into the trophic chain or toxicity to living organisms. These results are in agreement with the findings of other studies. Indeed Elless et al. (2006) found that in urban yards, exchangeable lead represented 0.3% of the total lead concentration, concluding that the lead remaining in the soil is strongly sorbed to the soil or exists in largely insoluble forms. Clemente et al. (2006), found that the lead concentration in soil solution never exceeded 0.5 mg kg^{-1} .

4.3.3.2.2 Arsenic, Copper, Zinc, Antimony and Tin

As, Cu and Zn have a behavior close to that of lead, with abnormal concentrations in the first centimeters. But we demonstrate that they occurred at lower concentrations.

Linear regression analysis performed between As, Cu and Zn and iron oxides showed a good correlation for these 3 metals with iron oxides, but only starting from 40cm (as shown in equations [2], [3] and [4]). The relationship governing the levels of pseudo-total [Cu] (mg kg^{-1}) and $[\text{Fe}_2\text{O}_3]$ (%) between 40 and 130 cm is the following:

$$[\text{Cu}] = 1.439 \times [\text{Fe}_2\text{O}_3] + 2.707 \quad (r^2 = 0.96; n = 9; p < 0.001) \quad [2]$$

This model is very close to that found by Lamy et al. (2006) in a deep unpolluted horizon of a Luvisol.

For arsenic and zinc the following relationships are obtained (between pseudo-total [As] mg kg^{-1} and $[\text{Fe}_2\text{O}_3]$ (%) and pseudo-total [Zn] mg kg^{-1} and $[\text{Fe}_2\text{O}_3]$ (%)):

$$[\text{As}] = 2.7961 \times [\text{Fe}_2\text{O}_3] + 1.3193 \quad (r^2 = 0.971; n = 9; p < 0.001) \quad [3]$$

$$[\text{Zn}] = 14.147 \times [\text{Fe}_2\text{O}_3] - 3.1793 \quad (r^2 = 0.99; n = 9; p < 0.001) \quad [4]$$

Concentrations in the samples between 0 and 40 cm did not follow these models. This indicates anthropogenic contamination of the first 40 centimeters, in agreement with the concentration anomalies at the surface described above. However, this contamination is much less marked than that observed for lead.

Sequential extraction results confirmed the regression analysis. Indeed, 86-90% As, 47-87% Cu and 66-82% Zn are contained in the 3 reducible fractions, indicating that even if there is As, Cu

and Zn contamination, iron and manganese oxides contain sufficient sites to retain these metals. Similar distributions have been reported in previous studies (Maiz et al., 2000; Ramos et al., 1994; Ahumada et al., 1999).

Sb and Sn present the same profile as lead: high concentrations in topsoil, which decrease with the depth. Indeed, unlike As, Cu and Zn, concentrations for Sb and Sn are much higher than normally found in the natural background. This is particularly problematic for Sb, which is considered by the US EPA (1979) with lead and arsenic as one of the priority pollutants. Linear regression analysis performed for these 2 metals, did not allow identification of the major bearing phase.

4.3.4 Modelling multi-metallic contamination

The metallic contamination can be firstly modeled according to depth. Sb, Sn, Cu, Zn, As and Pb pseudo-total concentrations (mg kg^{-1}) are maximum in the topsoil and decrease strongly with depth in the upper part of the profile following exponential models (figure 3) as below where z is the depth in centimeters:

$$[\text{Pb}] = 2197 e^{-0.0717 z} \quad r^2 = 0.971 \text{ (from 0 to 60 cm depth)}$$

$$[\text{Sb}] = 107 e^{-0.0871 z} \quad r^2 = 0.995 \text{ (from 0 to 60 cm depth)}$$

$$[\text{Zn}] = 86.95 e^{-0.0099 z} \quad r^2 = 0.791 \text{ (from 0 to 40 cm depth)}$$

$$[\text{Sn}] = 56 e^{-0.0768 z} \quad r^2 = 0.980 \text{ (from 0 to 50 cm depth)}$$

$$[\text{Cu}] = 39 e^{-0.0393 z} \quad r^2 = 0.977 \text{ (from 0 to 40 cm depth)}$$

$$[\text{As}] = 35.6 e^{-0.036 z} \quad r^2 = 0.999 \text{ (from 0 to 30 cm depth)}$$

In all these equations, the first coefficients indicate the absolute value of metallic contamination in the epipedon (for $z = 0$). It was maximum for Pb and decreased for the next elements in the following order $\text{Pb} > \text{Sb} > \text{Zn} > \text{Sn} > \text{Cu} > \text{As}$. Furthermore, the exponential coefficient indicated the contamination relative to natural content in the deep horizon giving another order $\text{Sb} > \text{Sn} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{As} > \text{Zn}$. While regression was calculated for Pb and Sb over 0-60 cm depth, it was only down to 50 cm for Sn, 40 cm for Zn and Cu and 30 cm for As. Consequently, Pb and Sb have moved further down the profile than Sn, which has moved more than Zn, Cu and finally As. The affinity of soil organic matter for lead and the possible migration of lead in organic colloids could be one of the mechanisms enhancing lead mobility along the profile according to Semlali (2000).

Secondly, the interrelationship between metals gives additional simple models (figure 5 and figure 6) to describe anthropogenic contamination: in this case metal-enriched atmospheric fallout (Pb, As, Cu, Zn, Sb and Sn) from the plant.

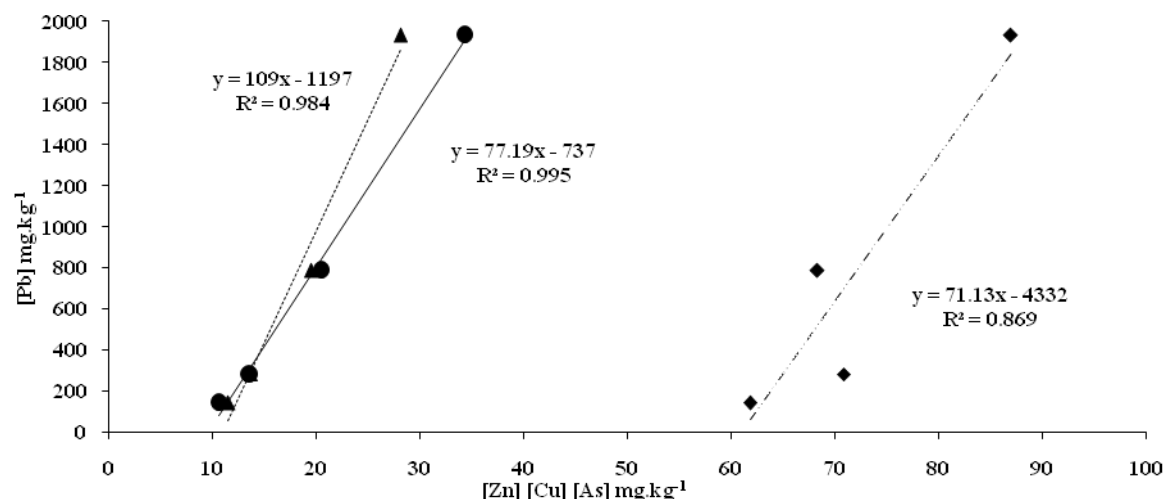


Figure 5: Correlation between soil pseudo-total lead and As (▲) or Cu (✱) or Zn (◆) concentrations in the first 40 cm

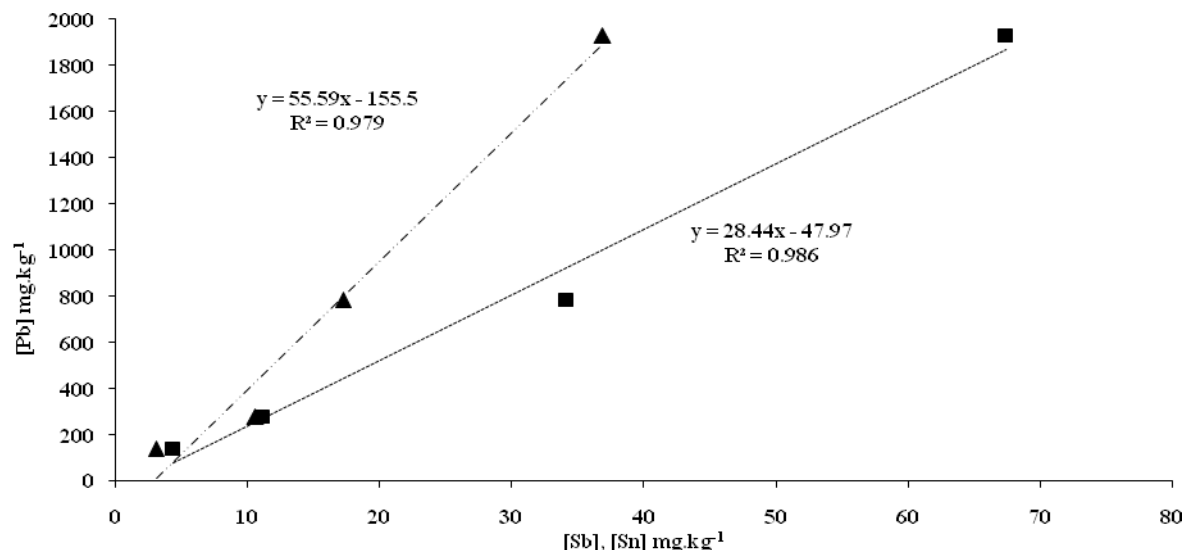


Figure 6: Correlation between soil pseudo-total lead and Sb (■) or Sn (▲) in the first 40 cm

Linear correlations between Pb and the other metals were observed. This confirms the hypothesis of multi-element contamination due to the plant's activity. This information is confirmed by SEM-EDS observation of the soil surface sample, most affected by the plant's activity. Indeed, it shows that among the 50 observation points, in more than 50% of the cases, lead was associated with Sb and Sn (figure 7). We also found Pb-Zn or Pb-Cu associations but which were much rarer only representing about 10 % of the associations. Lead also exists in aggregates containing of iron and manganese. In spite of the phosphorus contents, no Pb-P associations were found by such observations.

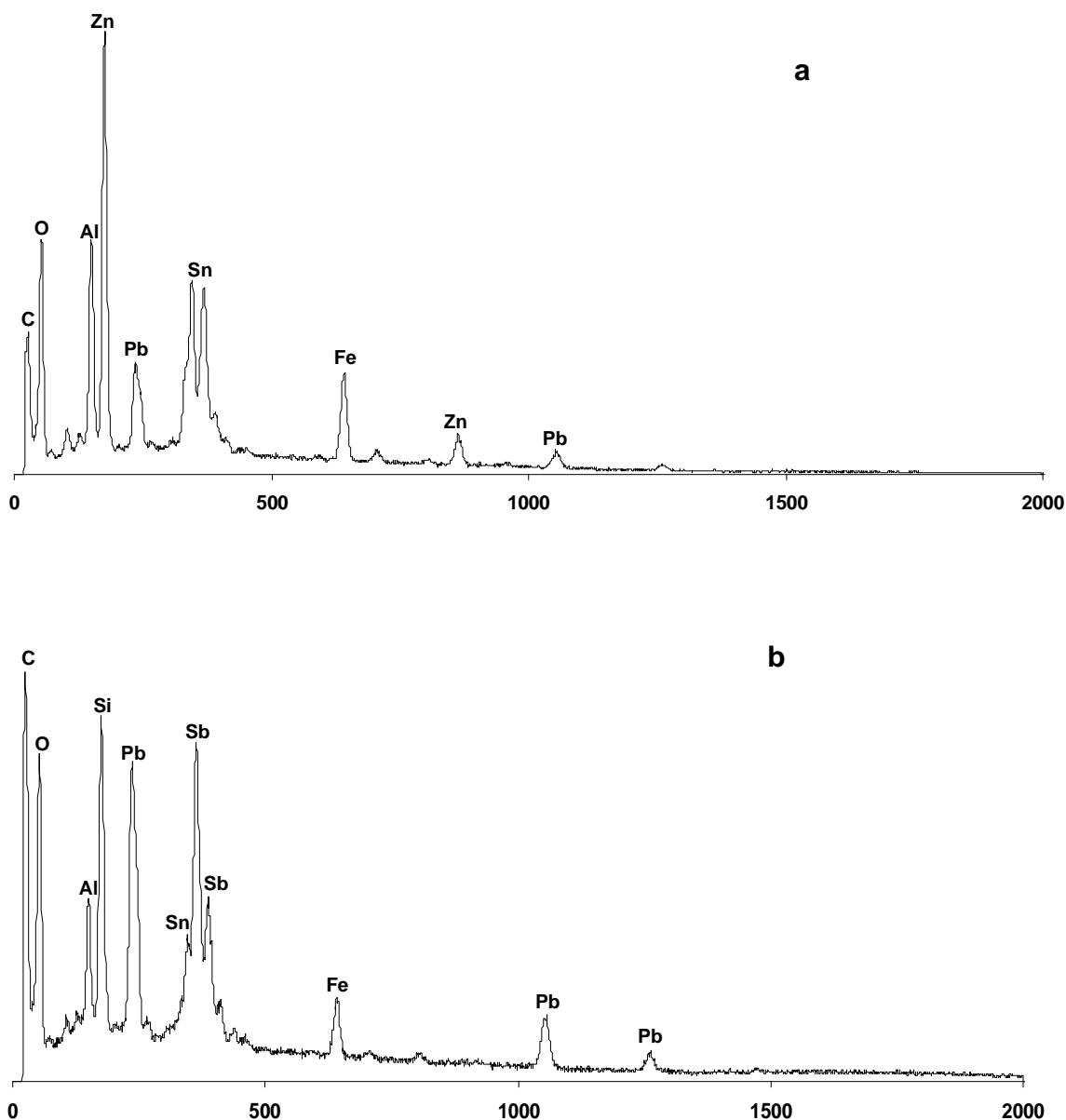


Figure 7: SEM-EDS observation for the surface soil

4.4 Conclusions and Perspectives

In regard to association with major elements, the trace elements did not have the same pattern along the profile. Ni and Cr showed a constant linear relation versus Fe along the profile indicating that their common origin is explained by geochemistry. On the contrary, Pb, Sb, Sn, As, Cu, and Zn did not obey the same model from the topsoil to the marl. Finally, the global pedological approach used in this study indicates that this industrial area has been severely affected by the activity of the lead recycling plant, leading to accumulations of multi-metallic contamination. Indeed, high Pb, Sb and Sn concentrations and, to a lesser extent, As, Cu, and Zn have been noted in the surface soil compared with background levels.

In particular, lead is mainly accumulated in the surface soil horizon due to its relatively low mobility and strong association to soil constituents. However, results of pseudo-total concentration combined with linear regression analysis showed that the anthropogenic lead migrated down to 60 cm, at 1.5 cm per year. Sb migrated with the same speed, while Sn moved a little slower, then Cu, Zn and finally As. Moreover, depending on the soil composition and the presence or absence of anthropogenic lead, the proportions of metals contained in the sequential extraction fractions can change. Indeed, in the uncontaminated deep horizons, the main lead carriers were iron oxides, while in the contaminated levels they were carbonates. This phenomenon illustrates the importance of studies using real contaminated soils and not simply artificially contaminated soils.

Moreover, sequential extraction performed on the 0-10 cm soil sample showed that the water soluble fraction contained 1.1 mg Pb kg⁻¹ and the exchangeable fraction contained 3.1 mg Pb kg⁻¹. Therefore, the topsoil horizon contains 4.2 mg kg⁻¹ lead easily mobilisable and available. This underlines the existence of a potential risk of transfer of lead to the biosphere. The ecological threat of lead is mainly associated with its mobility in the soil system which is controlled by its speciation and compartmentalization.

Acknowledgements

This work was supported by MENRT. The authors are very grateful to Thierry Aigouy for his participation for the SEM-EDS observations.

References

- Ahamed, M. and Siddiqui, M.K.J.**, 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clinica Chimica Acta*, 383 : 57–64.
- Ahumada, I., Mendoza, J., Ascar, L.**, 1999. Sequential extraction of heavy metals in soils irrigated with wastewater. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30: 1507-1519.
- Alkorta, I., Hernandez-Allica, J., Becerril, J.M., Amezcaga, I., Albizu, I., Garbizu, C.**, 2004. Recent findings of the remediation of soil contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. *Review in Environmental Science and Bio/Technology*, 3: 71-90.
- Alloway, B.J.**, 1995. Heavy metals in soils. Blackie Academic & Professional, London, 2nd Edition.
- Bacon, J.R., Farmer, J.G., Dunn, S.M., Graham, M.C., Vinogradoff, S.I.**, 2006. Sequential extraction combined with isotope analysis as a tool for the investigation of lead mobilisation in soils: Application to organic-rich soils in an upland catchment in Scotland. *Environmental Pollution*, 141: 469-481.
- Baize, D.**, 2002. Les éléments traces métalliques dans les sols. INRA éditions.
- Banat, K.M., Howari, F.M., Al-Hamad, A.A.**, 2005. Heavy metals in urban soils of central Jordan: Should we worry about their environmental risks? *Environmental Research*, 97: 258-273.
- BRGM**, 1978. Carte géologique de la France à 1/50000. Neuville-Aux-Bois. N°327. Ministère de l'industrie, du commerce et de l'artisanat. Bureau de recherches géologiques et minières. Service géologique national. BP 6009, Orléans, France.
- Cheshire, M.V., Dumat, C., Fraser, A.R., Hillier, S.J., Staunton, S.**, 2000. The interaction between soil organic matter and soil clay minerals by selective removal and controlled addition of organic matter. *European Journal of Soil Science*, 51: 497-509.

- Chirenje, T., Ma, L.Q., Reeves, M., Szulczewski, M.,** 2004. Lead distribution in near-surface soils of two Florida cities: Gainesville and Miami. *Geoderma*, 119: 113-120.
- Clemente, R., Escolar, A., Bernal, M.P.,** 2006. Heavy metal fractionation and organic matter mineralisation in contaminated calcareous soil amended with organic materials. *Bioresource Technology*, 97: 1894-1901.
- Cornu, S., Deschatrettes, V., Salvador-Blanes, S., Clozel, B., Hardy, M., Branchut, S., Le Forestier, L.,** 2005. Trace element accumulation in Mn-Fe-oxide nodules of a planosolic horizon. *Geoderma*, 125: 211-224.
- Dang, Z., Liu, C., Haigh, M.,** 2002. Mobility of heavy metals associated with the natural weathering of coal mine spoils. *Environmental Pollution*, 118: 419-426.
- Diyab, C., Juilliot, F., Dumat, C.,** 2003. Study of Pb phosphates in the rhizosphere soils of various plants by chemical and physical technics. International Conference on Metals in the environment, Grenoble.
- Dumat, C., Cheshire, M.V., Fraser A., Shand, C., Staunton, S.,** 1997. The effect of removal of soil organic matter and iron on the adsorption of radiocaesium. *European Journal of Soil Science*, 48: 675-683.
- Dumat, C., Chiquet, A., Gooddy, D., Aubry, E., Morin, G., Juilliot, F., Benedetti, M.F.,** 2001. Metal ion geochemistry in smelter-impacted soils and soil solutions. *Bulletin de la Société Géologique de France*, 172: 539-548.
- Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S., Benedetti, M.F.,** 2006. A study of the trace metal ion influence on the turn-over of soil organic matter in various cultivated contaminated soils. *Environmental Pollution*, 142: 521-529.
- Elless, M.P., Bray, C.A., Blaylock, M.J.,** 2007. Chemical behavior of residential lead in urban yards in the United States. *Environmental Pollution*, 148: 291-300.
- Ettler, V., Vanek, A., Mihajevic, M., Bezdzicka, P.,** 2005. Contrasting lead speciation in forest and tilled soils heavily polluted by lead metallurgy. *Chemosphere*, 58: 1449-1459.
- FAO,** 1998. World reference base for soil researchs. *World Soil Resources Report*, vol.84. FAO, Rome.
- Gavalda, D.,** 2001. Devenir des éléments traces métalliques dans les boubènes (luvi-redoxisol) après épandage de boues granulées. Thèse de doctorat, INP-ENSAT, 258p.
- Ge, Y., Murray, P., Hendershot, W.H.,** 2000. Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environmental Pollution*, 107: 137-144.
- Han, F.X., Banin, A., Kingery, W.L., Triplett, G.B., Zhou, L.X., Zheng, S.J. and Ding, W.X.,** 2003. New approach to studies of heavy metal redistribution in soil. *Advances in Environmental Research*, 8: 113-120.
- Ho, M.D., Evans, G.D.,** 2000. Sequential extraction of metal contaminated soil with radiochemical assessment of readsorption effects. *Environmental Science and Technology*, 34: 1030-1035.
- ISO 11466,** 1995. Soil quality. Extraction of trace elements soluble in aqua regia. International Organization of Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Kabala, C., Singh, B.R.,** 2001. Fractionation and mobility of copper, lead and zinc in soil profiles in the vicinity of a copper smelter. *Journal of Environmental Quality*, 30: 485-492.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H.,** 1992. Trace elements in soils and plants. 2nd edition CRC press, Boca Raton, FL.

- Lamy, I., Van Oort, F., Dere, C., Baize, D.**, 2006. Use of major – and trace - element correlations to assess metal migration in a sandy Luvisol irrigated with waste water. *European Journal of Soil Science*, 57: 731-740.
- Leleyter, L., Probst, J.L.**, 1998. A new sequential extraction for the speciation of particulate trace elements in river sediments. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 73: 109-128.
- Maiz, I., Arambarri, I., Garcia, R., Millán, E.**, 2000. Evaluation of heavy metal availability in polluted soils by two sequential extraction procedures using factor analysis. *Environmental Pollution*, 110: 3-9.
- Navas, A., Machin, J.**, 2002. Spatial distribution of heavy metals and arsenic in soils of Aragon (northeast Spain): controlling factors and environmental implications. *Applied Geochemistry*, 17: 961-973.
- Quevauviller, P., Vand Der Sloot, H.A., Muntau, H., Gomez, A., Rauret, G.**, 1996. Conclusion of the workshop: harmonization of leaching/extraction tests for environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 178: 133-139.
- Raksasataya, M., Langdon, A.G., Kim, N.D.**, 1996. Assessment of the extend of lead redistribution during sequential extraction by two different methods. *Analytica Chimica Acta*, 332: 1-14.
- Ramos, L., Hernandez, L.M., Gonzales, M.J.**, 1994. Sequential fractionation of copper, lead, cadmium and zinc in soils from Donana National park. *Journal of Environmental Quality*, 23: 50-57.
- Schramel, O., Michalke, B., Kettrup, A.**, 2000. Study of the copper distribution in contaminated soils of hop fields by single and sequential extraction procedures. *Science of the Total Environment*, 263: 11-22.
- Semlali, R.**, 2000. Localisation, dynamique et estimation de flux d'éléments traces métalliques dans les sols. PhD ENGREF, Paris, France, 112p.
- Sipos, P., Nemeth, T., Mohai, I., Dodony, I.**, 2005. Effect of soil composition on adsorption of lead as reflected by a study on a natural forest soil profile. *Geoderma*, 2005: 363-374.
- Sparks, D.L.**, 1995. *Environmental soil chemistry*. Academic Press, New-York.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M.**, 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51: 844-851.
- Tyler, G.**, 2004. Vertical distribution of major, minor, and rare elements in Haplic Podzol. *Geoderma*, 119: 277-290.
- Ure, A.M., Davidson, C.M., Thomas, R.P.**, 1995. Single and sequential extraction schemes for trace metal speciation in soils and sediments. In: Quevauviller, P., Maier, E.A., Griepink, B. (Eds.). *Quality Assurance for environmental analysis (BCR)*, Elsevier pp. 505-523.
- US EPA**, 2001. Identification of dangerous levels of lead: final rule. Vol. 66, No. 4, *Federal Register* January 5, 1205-1240.
- US EPA**, 1979. Water related fate of the 129 priority pollutants EP-440/4-79-029A. Washington DC. Vol. 1.
- Velde, B., Church, T., Bauer, A.**, 2003. Contrasting trace element geochemistry in two American and French salt marshes. *Marine Chemistry*, 83: 131-144.

Chapitre II Autres méthodes d'investigation du plomb dans le sol

Introduction

L'étude des concentrations en plomb le long du profil est une première étape pour évaluer le degré de contamination du sol par les retombées atmosphériques d'une usine de recyclage du plomb. Les résultats ont montré que ces retombées s'accumulent dans les horizons de surface mais peuvent également être mobilisées vers la profondeur. Ainsi, nous avons démontré dans le chapitre I que le plomb provenant de l'activité de l'usine s'était accumulé dans l'horizon de surface ($2048 \pm 103 \text{ mg.kg}^{-1}$), puis que la concentration diminuait rapidement. Les comparaisons avec les concentrations habituellement retrouvées dans le fond géochimique de cette zone, complétées par les extractions chimiques séquentielles ont mis en évidence que le plomb provenant de l'activité de l'usine avait migré jusqu'à environ 60 cm de profondeur.

Ces résultats obtenus par l'analyse globale du profil méritaient d'être confirmés par des méthodes d'investigation complémentaires. Tout d'abord, les teneurs en plomb déterminées par l'extraction à l'eau régale ont été validées par un extractant plus agressif permettant la dissolution complète des silicates. Ensuite ces nouvelles teneurs en plomb total ont été normalisées par rapport à un élément chimique issu strictement du fond géochimique de manière à calculer l'enrichissement anthropique en plomb tout le long du profil. Cet enrichissement a été également étudié par la composition isotopique du plomb de ces mêmes échantillons. Enfin, tous ces résultats ont été confrontés à des observations directes de l'horizon le plus contaminé en microscopie électronique à balayage (MEB) et en microsonde.

1 Extractions totales à l'acide fluorhydrique

1.1 Comparaison entre l'extraction à l'eau régale et celle à l'acide fluorhydrique

Dans le chapitre précédent, les concentrations totales en plomb le long du profil du sol ont été obtenues après minéralisation à l'eau régale. Ce mélange d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique est souvent utilisé pour réaliser des analyses de routine, cette méthode bénéficiant même d'une norme ISO (ISO 11466, 1995). Cependant, les concentrations obtenues après minéralisation sont des concentrations pseudo-totales, certains silicates pouvant résister aux acides nitrique et chlorhydrique entrant dans la composition de l'eau régale (Ure et al., 1995 ; Gupta et al., 1996 ; Sterckemann et al., 2000). Pour estimer l'efficacité de la digestion à l'eau régale, les mêmes échantillons du profil du sol ont ensuite été soumis à une attaque dite « totale » réalisée par la société Antellis avec un mélange d'acide nitrique et d'acide fluorhydrique. Pour cela, 0.1g d'échantillons broyés ($<100\mu\text{m}$) sont

PARTIE III : Comportement du plomb le long du profil du sol

mélangés avec 0.2 ml d'acide fluorhydrique (HF), 2 ml d'acide nitrique, et 0.5 ml d'acide chlorhydrique dans des réacteurs téflon de 7 ml de capacité. Les échantillons sont ensuite déposés sur une plaque chauffante à 100°C durant 48 heures au moins. Les reprises se font avec de l'eau ultra pure. Les mesures sont alors réalisées par ICP-MS. Les deux séries de données sont présentées dans le Tableau 8, la Figure 19 et la Figure 20.

Profondeur (cm)	mg.kg ⁻¹	
	[Pb] Eau Régale	[Pb] Total HF
0-10	1932.58 ± 7.40	2048 ± 103
10-20	785.02 ± 1.54	813 ± 38
20-30	279.88 ± 8.19	306 ± 13
30-40	139.48 ± 8.29	165 ± 7
40-50	83.40 ± 1.46	100 ± 5
50-60	56.26 ± 0.78	67 ± 3
60-70	44.89 ± 0.90	58 ± 2
70-80	31.83 ± 0.64	41.9 ± 1.9
80-90	41.79 ± 0.84	61 ± 3
90-100	35.60 ± 0.71	50 ± 2
100-110	23.48 ± 0.47	25.6 ± 1.1
110-120	3.63 ± 0.07	6.9 ± 0.3
120-130	3.59 ± 0.07	8 ± 0.4

Tableau 8 : Concentrations en plomb obtenues après digestion à l'eau régale et après attaque à l'HF le long du profil du sol.

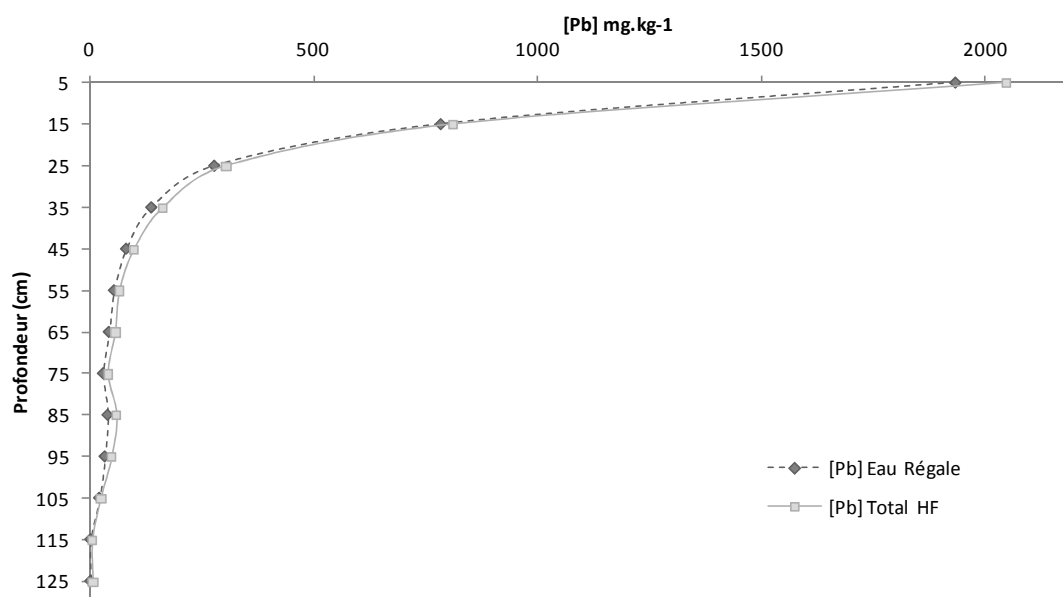


Figure 19 : Concentrations en plomb obtenues après digestion à l'eau régale et après attaque à l'HF en fonction de la profondeur.

Nous avons constaté qu'entre 45 et 97 % du plomb total ont été extrait par l'eau régale. Les meilleurs résultats étant obtenus pour les horizons présentant des concentrations en plomb élevées. Les écarts les plus grands (entre total et extraction eau régale) ont été obtenus pour les 2 derniers horizons pour lesquels on a 53 et 45% de plomb extrait par l'eau régale. Ce sont des horizons qui ont de faibles concentrations (7 et 8 mg.kg⁻¹). Le plomb anthropique dans les horizons de surface semble être plus récent et plus soluble qu'en profondeur. Le phénomène « d'aging » (stabilisation irréversible) semble faire évoluer le plomb vers des formes plus résistantes.

De plus, comme le montre la Figure 20, il y a une bonne relation linéaire entre le plomb extrait à l'eau régale et celui extrait par attaque totale. La fonction obtenue en Figure 20 montre que, en moyenne, sur l'ensemble du profil, l'eau régale permet d'extraire 95% du plomb total. Des résultats similaires avaient été obtenus dans une étude comparative réalisée par Scancar et al. (2000) sur des sédiments. Les éléments non dissous par l'eau régale sont probablement au sein des réseaux cristallins des silicates résistants. Ces minéraux primaires seraient donc en relativement faible proportion dans le sol étudié.

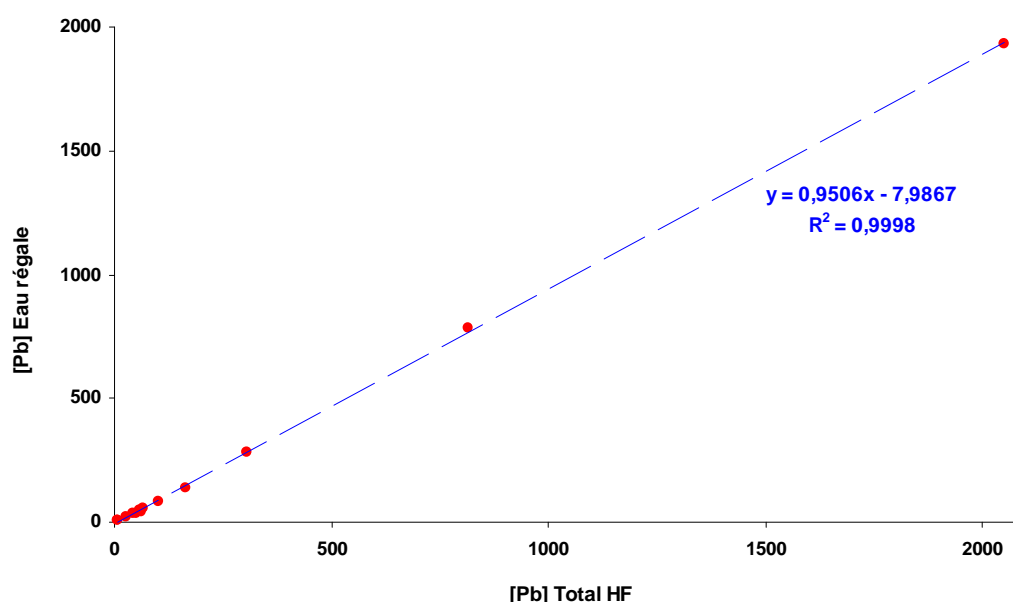


Figure 20 : Relation linéaire entre les concentrations en plomb obtenues après digestion à l'eau régale et après attaque à l'HF pour les divers échantillons le long du profil du sol (avec n=13 et p=0)

1.2 Facteur d'enrichissement

Afin d'estimer la contribution du fond géochimique et celle de la pollution, un facteur d'enrichissement a été calculé. Le facteur d'enrichissement (noté FE) représente l'abondance relative d'un élément chimique en comparaison avec les teneurs normalisées observées dans un matériau de référence (Bur, 2005). Ici, nous utiliserons les valeurs observées dans la roche mère, dans l'horizon le plus profond (120-130 cm) comme matériau de référence. Un facteur d'enrichissement est calculé pour chaque horizon, comme suit dans l'équation 1, où EN représente l'élément normalisant.

$$FE = (Pb/EN)_{\text{Horizon}} / (Pb/EN)_{\text{roche mère}} \quad (1)$$

En l'absence d'enrichissement ou d'appauvrissement, ce rapport est égal à 1. S'il y a des apports anthropiques ce rapport augmente proportionnellement à l'intensité de la pollution. Andrews et Sutherland (2004) ont établi un index de pollution comprenant 5 catégories, définies comme suit :

$FE < 2 \rightarrow$ pollution minime

$2 < FE < 5 \rightarrow$ pollution modérée

$5 < FE < 20 \rightarrow$ pollution significative

$20 < FE < 40 \rightarrow$ pollution élevée

$FE > 40 \rightarrow$ pollution extrême

Dans cette étude, le thorium a été choisi comme élément normalisant. Le scandium (Sc) est plus généralement utilisé comme élément normalisant. Il a, dans ce cas, été écarté car une étude sur les retombées atmosphériques issues du processus de l'usine a montré la présence de Sc dans les particules (Uzu, 2007). Les concentrations en Sc retrouvées dans le sol pourraient donc être enrichies de façon variable selon la profondeur. Le Th quant à lui n'a pas été retrouvé dans les particules prélevées sur les filtres des cheminées (Uzu, 2007), c'est pourquoi nous l'avons choisi comme élément de normalisation, en supposant qu'il n'y avait aucune contamination en Th dans le sol. L'autre hypothèse forte sous-jacente à ces calculs est qu'au cours du processus pédogénétique le thorium a le même comportement que le plomb issu du fond géochimique, c'est-à-dire $[Pb]_{\text{endogène}} / [Th]$ est constant le long du profil de sol (Semlali, 2001). Le plomb issu du fond géochimique est appelé plomb endogène, celui issu de la contamination est appelé plomb anthropique. L'équation suivante permet d'estimer la concentration en plomb endogène dans chaque échantillon du profil du sol :

$$[Pb]_{\text{endogène}} = [Th]_{\text{horizon}} \times ([Pb]_{\text{roche mère}} / [Th]_{\text{roche mère}}) \quad (2)$$

Dans cette étude, nous avons utilisé la concentration en plomb et thorium dans la roche mère (horizon 120-130 cm) comme niveau de référence. Puis le plomb anthropique est évalué grâce aux équations suivantes:

$$[Pb]_{\text{anthropique}} = [Pb]_{\text{horizon}} - [Pb]_{\text{endogène}} \quad (3)$$

$$\% [Pb]_{\text{anthropique}} = ([Pb]_{\text{horizon}} - [Pb]_{\text{endogène}}) / [Pb]_{\text{horizon}} \times 100 \quad (4)$$

Les résultats obtenus en appliquant ces 4 équations à chaque horizon de sol sont présentés dans le Tableau 9.

Profondeur (cm)	[Pb] _{HF}	[Pb] _{endogène}	[Pb] _{anthropique}	FE	% Pb _{anthropique}
	mg.kg ⁻¹				
0-10	2048	57	1991	36	97
10-20	813	47	766	17	94
20-30	306	46	260	7	85
30-40	165	45	120	4	73
40-50	100	47	53	2	53
50-60	67	52	15	1	23
60-70	58	50	8	1	14
70-80	41.9	50	-8	1	-18
80-90	61	51	10	1	17
90-100	50	27	23	2	46
100-110	25.6	13	12	2	48
110-120	6.9	9	-2	1	-29
120-130	8	8	0	1	0

Tableau 9 : Facteur d'enrichissement et répartition du plomb anthropique en référence au Th (équations (1) à (4))

Comme le montrent le Tableau 9 puis la Figure 21 ce facteur d'enrichissement varie de 36 en surface à 2 dans l'horizon d'altération de la marne. Ce facteur d'enrichissement varie exactement de la même manière que les concentrations totales en plomb. La corrélation entre les 2 paramètres donne l'équation suivante :

$$y = 0.02x + 0.738 \text{ avec un } r^2 = 0.993$$

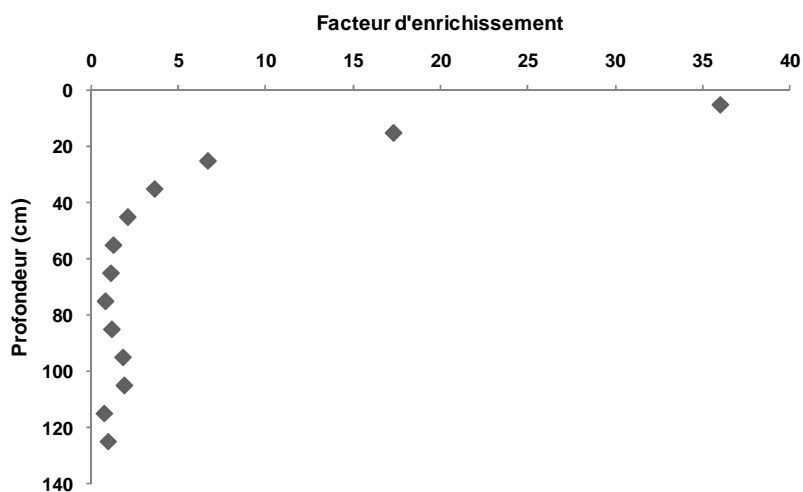


Figure 21 : Evolution du facteur d'enrichissement du plomb en fonction de la profondeur.

Dans le profil de sol étudié, l'horizon de surface est dans la catégorie pollution très élevée, très proche même de la pollution extrême (FE=36 dans l'horizon 0-10 cm). Puis les 2 horizons suivants (donc entre 10 et 30 cm) sont dans la catégorie pollution significative. A partir de 50 cm, le facteur d'enrichissement est égal à 1 ou 2 jusqu'au fond du profil. Cela signifie que nous sommes dans une zone de pollution minimale. Ces résultats sont cohérents avec ceux retrouvés grâce à l'approche pédologique. En effet, nous avons conclu à une pollution très importante en surface, diminuant avec la profondeur, ainsi qu'une migration du plomb anthropique autour de 50 à 60 cm.

1.3 Apports anthropiques calculés selon l'approche pédologique

L'une des principales conclusions à laquelle nous a conduit l'approche pédologique suivie dans le chapitre I, est que la teneur en fer permet de retrouver les teneurs en plomb endogène le long du profil (figure 3 du chapitre I). Les concentrations en plomb endogène peuvent être calculées à partir de l'équation reliant le plomb aux oxydes de fer décrite précédemment (équation (1) chapitre I) :

$$[\text{Pb}]_{\text{endogène}} = 9.4883 [\text{Fe}_2\text{O}_3] + 2.9787$$

A partir des concentrations trouvées, le plomb anthropique est calculé par différence avec le plomb total :

$$[\text{Pb}]_{\text{anthropique}} = [\text{Pb}]_{\text{ER}} - [\text{Pb}]_{\text{endogène}}$$

Avec $[\text{Pb}]_{\text{ER}}$ correspondant à la concentration en plomb extraire à l'eau régale.

Profondeur (cm)	Fe ₂ O ₃	[Pb] _{ER}	[Pb] _{endogène}	[Pb] _{anthropique}	% Pb _{anthropique}
				mg.kg ⁻¹	
0-10	3.31	1933	34	1898	98
10-20	3.50	785	36	749	95
20-30	3.51	280	36	244	87
30-40	3.43	139	36	104	75
40-50	3.79	83	39	44	53
50-60	3.91	56	40	16	29
60-70	4.24	45	43	2	4
70-80	4.54	32	46	-14	-45
80-90	4.70	42	48	-6	-14
90-100	2.53	36	27	9	24
100-110	1.41	23	16	7	30
110-120	0.83	4	11	-7	0
120-130	0.74	4	10	-6	0

Tableau 10 : Répartition du plomb anthropique calculé selon l'approche pédologique.

Les résultats (Tableau 10) montrent des concentrations en plomb endogène maximales à 90 cm de profondeur qui diminuent progressivement vers la surface, pour atteindre 34 mg.kg⁻¹ à la

PARTIE III : Comportement du plomb le long du profil du sol

surface du sol. Avec la méthode de normalisation par le thorium (Tableau 9) ces mêmes concentrations sont très proches de celles calculées par l'approche pédologique, avec une valeur un peu plus forte en surface (57 mg.kg^{-1}).

Ramenée aux teneurs totales en plomb, la contamination anthropique peut être exprimée en pourcentage (Tableau 9 et Tableau 10). Les valeurs obtenues selon les deux méthodes sont très voisines : elles atteignent 98% en surface et diminuent progressivement jusqu'à 60 cm de profondeur. En dessous, les deux méthodes donnent des résultats divergents (Figure 22). Certains donnent même des valeurs négatives qui doivent être considérées comme étant égales à 0, mais qui traduisent le niveau d'imprécision de ces calculs dû aux faibles concentrations totales en plomb dans ces horizons. Globalement les deux approches donnent des concentrations en plomb anthropique très proches (Figure 23), qui démontrent une contamination évidente en plomb jusqu'à 60 cm de profondeur, et beaucoup moins évidente en dessous.

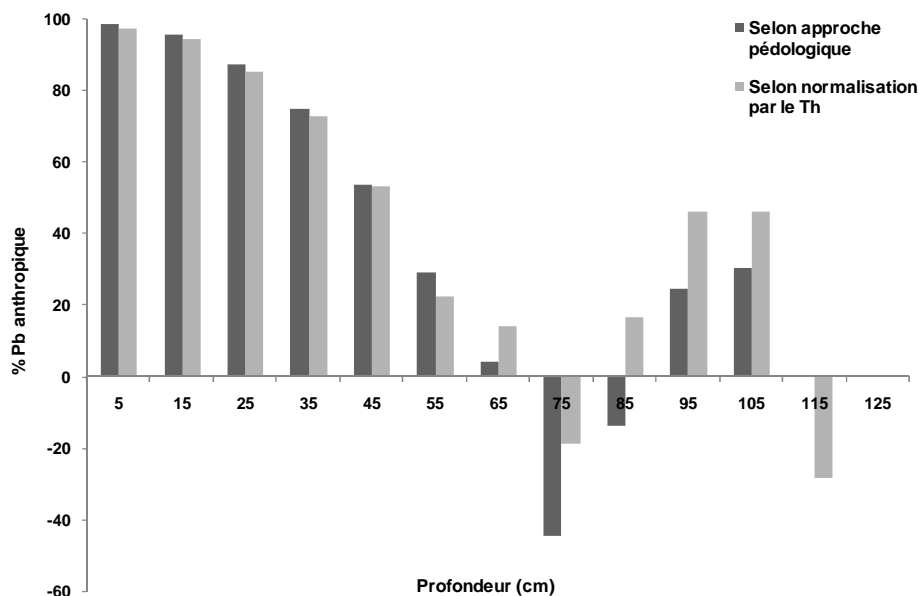


Figure 22 : Pourcentage de plomb anthropique calculé selon les deux approches

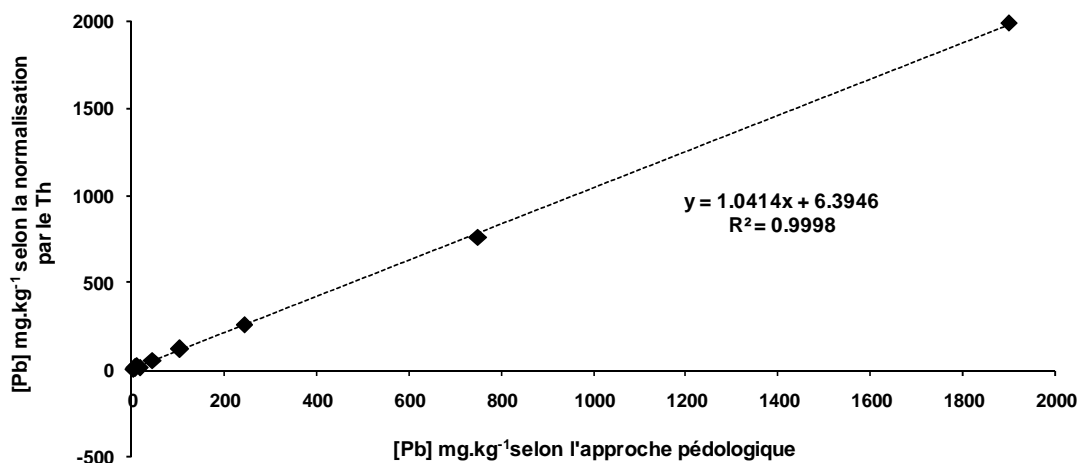


Figure 23 : Teneurs en plomb anthropique calculées selon les deux approches.

2 Isotopie du plomb

2.1 Introduction

De nombreuses études ont récemment montré l'utilité des isotopes stables du plomb comme traceurs de sources de pollution (Monna et al., 1997 ; Semlali et al., 2001 ; Ettler et al., 2004 ; Komarek et al., 2007a). Chaque source de plomb a une signature isotopique caractéristique, qui ne se modifie pas au cours des processus physico-chimiques ou physiques. Les isotopes représentent donc un outil puissant pour tracer l'origine d'une contamination.

Le plomb possède 4 isotopes stables : ^{204}Pb , ^{206}Pb , ^{207}Pb et ^{208}Pb . Les 3 derniers sont des isotopes avec une composante primordiale (présente dès la formation de la terre) et une composante radiogénique. Cette partie radiogénique est produite par la décomposition radioactive de ^{238}U , ^{235}U et ^{232}Th respectivement (Monna et al, 1997). Les minéraux contenant du plomb présentent des signatures isotopiques qui dépendent principalement de la composition originale et de l'âge des gisements. Les émissions de plomb d'origine anthropique reflètent la composition isotopique du minerai dont ils sont issus (Henandez, 2003). Les rapports isotopiques peuvent servir comme traceurs de sources de pollution « anthropiques » par rapport aux sources « endogènes ».

En ce qui concerne les sources « anthropiques » du plomb, on remarque 2 sources principales, celles liées à l'industrie et celles associées aux carburants automobiles. En effet, du plomb sous forme de tétraméthyle $\text{Pb}(\text{CH}_3)_4$ ou tétraéthyle $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ a longtemps été incorporé à l'essence du fait de ses propriétés antidétonantes. Ceci a donc été une source importante de dissémination de plomb dans l'atmosphère, puis dans l'environnement. C'est pourquoi, l'utilisation du plomb dans l'essence a peu à peu diminué pour limiter les émissions de plomb, jusqu'à être interdite en 2000 en Europe. D'après Monna et al (1997), le plomb de l'essence française possède un rapport isotopique $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ compris entre 1.069 et 1.094 et un rapport $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ compris entre 2.191 et 2.198. La signature isotopique du plomb industriel est quand à elle difficile à établir. En effet, selon Véron et al (1999), le plomb industriel peut couvrir une large gamme de composition isotopique car il englobe les émissions générées par les industries lourdes (métallurgie et sidérurgie) et celles dues à l'incinération des ordures ménagères. Celles-ci sont en général plus radiogènes que les émissions automobiles. Ces différentes sources industrielles aboutissent à une signature isotopique de la pollution anthropique variable en fonction de chacune d'elles. Cette signature a aussi évolué au cours du temps, selon l'évolution de l'industrie et de l'utilisation de l'essence plombée, totalement dépendante de l'âge du minerai dont est issu le plomb. Le Tableau 11 ci-dessous présente une gamme de signatures isotopiques retrouvées pour le plomb industriel, dans diverses études.

Sources	$^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$	$^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	Références
Essence en France	1.0693-1.0943	2.1705-2.1984	
Incinérateur (Sète, France)	1.1427-1.1547	2.1070-2.1236	Monna et al (1997)
Emissions Industrielles (France)	1.155	2.112	
Métallurgie du plomb (Metaleurop)	1.1323-1.1336	2.1263-2.1275	
Métallurgie de l'acier	1.1786-1.2226	2.00352.0537	
Métallurgie Mn-Fe	1.1064-1.1176	2.1406-2.1575	Veron et al (1999)
Air zone urbaine (Paris) en 1995	1.1373	2.1231	
Air zone rurale (Alsace) en 1994	1.1480	2.1059	
Résidus de recyclage de batteries (filtres)	1.177	2.081	Ettler et al (2004)
Scories de recyclage de batteries (scories)	1.169	2.100	

Tableau 11 : Signatures isotopiques de diverses sources émettrices de plomb

Wong (2004) a calculé des temps de résidence du plomb dans l'atmosphère (à partir du plomb ^{210}Pb). Il a conclu qu'après 6 à 10 jours dans l'atmosphère, le plomb précipite selon des mécanismes secs ou humides, et se retrouve dans tous les réservoirs naturels, dont les sols. Le plomb que l'on retrouve dans les différents réservoirs naturels a une composition isotopique intermédiaire entre celle d'un plomb purement anthropique et celle d'un plomb endogène. La composition isotopique que l'on détermine dépend de la proportion relative de chacune des sources (Hernandez, 2003). A partir du moment où le plomb est émis dans l'atmosphère, sa composition isotopique n'est plus modifiée et devient l'empreinte de la source émettrice. Ainsi, il est possible de tracer les contaminations et de reconstituer les mécanismes de transport, même en cas de très grande distance entre le point considéré et la source d'émission.

Dans la plupart des références bibliographiques (Tableau 10), les rapports isotopiques calculés sont $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ et $^{206}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$. Monna et al. (1997) ; Veron et al. (1999) ; Teutsch et al. (2001) ; Ettler et al. (2004) ; Komarek et al. (2007b) ont utilisé ces deux rapports pour différencier les origines du plomb.

2.2 Mesures

Les mesures des rapports isotopiques $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ et $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ ont été réalisées par ICP-MS quadripolaire SerieX2 de marque Thermo Electron, au laboratoire Antellis de Toulouse. Le contrôle du biais de masse est réalisé par comparaison avec le matériau de référence certifiée pour les rapports isotopiques du plomb NIST 981. Une mesure des rapports isotopiques du plomb du matériau de référence est effectuée toutes les 2 analyses d'échantillon. Les rapports isotopiques du plomb mesurés dans les échantillons sont corrigés de l'écart entre la mesure et la valeur théorique du

matériau de référence certifié. Les incertitudes (2s) sur les rapports isotopiques de plomb sont de l'ordre de 0.2 à 0.3%.

2.3 Résultats

Profondeur	$^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$	$^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	$^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$
0-10	1.1616 ± 0.0018	2.1263 ± 0.0038	2.4698 ± 0.0034
10-20	1.1655 ± 0.0016	2.1253 ± 0.0044	2.4757 ± 0.0046
20-30	1.1707 ± 0.0018	2.0789 ± 0.0038	2.4355 ± 0.0040
30-40	1.1677 ± 0.0018	2.1260 ± 0.0036	2.4848 ± 0.0040
40-50	1.1665 ± 0.0024	2.1367 ± 0.0038	2.4945 ± 0.0056
50-60	1.1767 ± 0.0022	2.1083 ± 0.0044	2.4828 ± 0.0048
60-70	1.1777 ± 0.0020	2.1034 ± 0.0036	2.4769 ± 0.0042
70-80	1.1848 ± 0.0024	2.0849 ± 0.0044	2.4678 ± 0.0050
80-90	1.1756 ± 0.0020	2.1082 ± 0.0042	2.4788 ± 0.0054
90-100	1.1686 ± 0.0020	2.1092 ± 0.0038	2.4640 ± 0.0044
100-110	1.1655 ± 0.0024	2.0936 ± 0.0048	2.4413 ± 0.0046
110-120	1.1986 ± 0.0030	2.0514 ± 0.0046	2.4590 ± 0.0054
120-130	1.1907 ± 0.0028	2.0595 ± 0.0044	2.4539 ± 0.0054

Tableau 12 : Rapports isotopiques mesurés le long du profil de sol

Le rapport isotopique $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ (Tableau 12) mesuré pour ce profil de sol varie entre 1.1616 en surface et 1.1986 en profondeur. Concernant le rapport $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$, il est compris entre 2.1253 en surface et 2.0514 en profondeur. Le rapport $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ quant à lui présente une variation plus aléatoire (entre 2.4355 et 2.4945). Nous pouvons bien observer une différence entre les rapports isotopiques de surface et de profondeur. Il faut cependant noter que l'échantillon 20-30 cm présente des rapports isotopiques plus proches de ceux de profondeur que de ceux de surface (surtout le rapport $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$). Ceci pourrait éventuellement être dû à une erreur de mesure.

Les rapports $^{206}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$ et $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ obtenus le long du profil sont reportés sur la Figure 24 ainsi que les signatures isotopiques de diverses sources de contamination trouvées dans la littérature. En effet, dans cette étude, il n'a pas encore été possible de mesurer ces rapports isotopiques dans les particules directement émises par l'usine.

Sur la Figure 24, trois groupes de points se dégagent de l'ensemble du profil. Les points correspondant aux échantillons de surface (losanges) forment un groupe de points légèrement séparé des autres, en haut du graphe (à l'exception du point 20-30 cm, qui a déjà été évoqué précédemment). Ces points correspondent aux échantillons pour lesquels nous avons vu précédemment une contamination anthropique due à l'activité de l'usine. Il faut noter que nous avons trouvé que le plomb anthropique avait migré jusqu'à environ 60 cm. Ceci est visible sur le graphe, en

effet, la signature isotopique de l'échantillon 50-60 cm se situe à la limite entre les 2 premiers groupes de points. Le deuxième groupe (carrés) correspond aux points intermédiaires du profil du sol (60-110 cm). Dans la première partie de l'étude, nous avons conclu que le plomb anthropique n'avait pas migré jusque là. L'analyse isotopique démontre une différence marquée entre le plomb des 50 premiers centimètres et celui des niveaux les plus profonds (130 cm). Cette différence devient ensuite moins marquée entre 60 et 110 cm. Enfin, les 2 derniers points (cercles) sont les 2 échantillons situés dans la marne, qui présentent la signature isotopique du plomb endogène de cette zone.

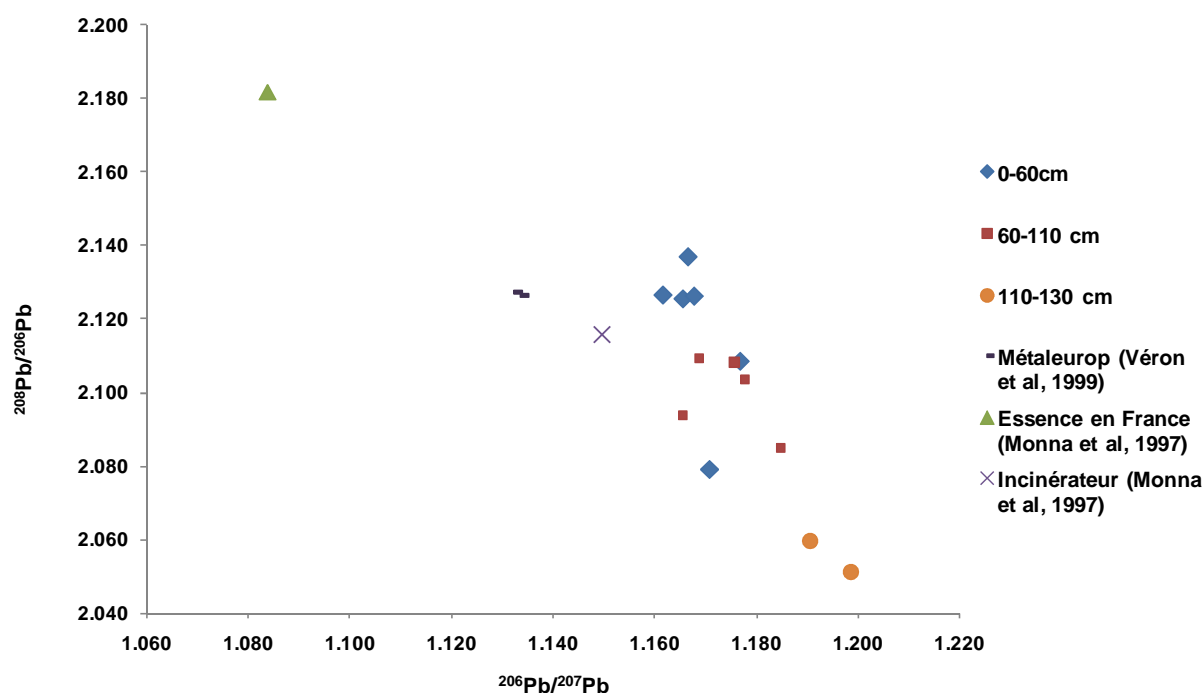


Figure 24 : Rapports isotopiques des échantillons de sol et signatures isotopiques de différentes sources.

Les retombées atmosphériques provenant de la fonderie de Noyelle-Godault du groupe Métaleurop ont des rapports $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ et $^{206}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$ moyens de 1.1329 et 2.1269 respectivement (Véron et al, 1999). Cette usine, dont l'exploitation a été complètement arrêtée en 2003, avait une activité très similaire à l'usine étudiée dans cette étude. Le graphe montre bien que les signatures isotopiques de Métaleurop sont assez proches des points de surface du profil de sol étudié, malgré un rapport $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ légèrement plus faible pour les retombées atmosphériques de Métaleurop. Le pôle des essences, quant à lui est plus éloigné, du nuage de point, cependant, il est quand même plus proche des points de surface que des points de profondeur, ce qui peut laisser penser à une influence du plomb rajouté dans les essences sur la signature isotopique des échantillons de surface. Cependant, le pôle des essences n'est pas strictement aligné sur la même droite que les points du profil. Deux interprétations peuvent être données à cela. Premièrement, le plomb recyclé dans l'usine n'est peut-être pas de la même composition isotopique que les essences. L'analyse isotopique des particules prélevées dans l'usine permettra de déterminer avec précision les signatures des sources émettrices actuelles. Deuxièmement, il est important de garder en mémoire le fait que le profil pédologique soit bilithique c'est-à-dire qu'un loess s'est déposé au quaternaire au dessus de la marne

tertiaire. Même si les matériaux constituant ce loess sont probablement de nature et d'âge similaires à ceux de la marne, il n'est pas certain que sa composition isotopique soit strictement identique à celle de la marne. C'est peut-être cela qui gêne l'interprétation du signal le long du profil, d'autant plus que les molasses tertiaires non contaminées analysées par Bur (2005 et thèse en cours) donnent des points qui se rapprochent des ceux de notre profil. La composition isotopique du même loess en l'absence de toute contamination aiderait à l'interpréter ces résultats.

Finalement, alors que la contamination apparaît encore évidente entre 0 et 50 cm de profondeur puisque les rapports isotopiques se rapprochent de ceux trouvés par Véron et al (1999) autour de l'usine Métaleurop, le signal isotopique est plus compliqué à interpréter en-dessous. Enfin à 1.30 m de profondeur, les deux derniers points nous permettent de connaître la signature isotopique de la roche mère de la région (marne de Balmont du tertiaire), le facteur d'enrichissement y atteignant progressivement la valeur 1 en même temps que le pourcentage de plomb anthropique donnant des valeurs négatives doit être considéré comme nul.

3 Apport de la microscopie électronique à balayage et de la microsonde à l'étude du sol de surface

Afin de confirmer les résultats obtenus après analyse chimique, une étude des métaux du sol de surface à une micro-échelle a été réalisée. Tout d'abord, le Microscope Electronique à Balayage (MEB), couplé à une sonde analytique (EDX) a permis une visualisation du plomb et des métaux environnants. Ensuite la composition chimique plus précise des composés riches en métaux de cet échantillon de sol a pu être obtenue grâce à une microsonde électronique.

Au cours du chapitre I, nous avons réalisé une étude de la spéciation au sens large par des méthodes d'extractions chimiques séquentielles (méthode indirecte). Ceci nous a permis d'identifier des phases porteuses majoritaires, ainsi qu'une contamination concomitante par d'autres métaux, tels que, notamment l'antimoine, l'étain, et dans une moindre mesure, l'arsenic, le cuivre et le zinc.

Nous avons choisi de compléter cette approche indirecte par des méthodes d'analyse directe présentées dans ce chapitre. Les travaux présentés ici visent à compléter les résultats obtenus par ces méthodes d'analyses chimiques. Les objectifs sont donc de réaliser un repérage qualitatif des éléments se trouvant à proximité du plomb dans l'échantillon observé par microscopie électronique à balayage (MEB), puis d'identifier l'environnement du plomb par microsonde électronique.

Nous avons choisi d'étudier l'échantillon de sol de surface (0-10 cm). Cet échantillon étant le plus fortement contaminé en plomb et en autres métaux, c'était celui dans lequel nous étions le plus susceptibles d'observer le plomb et éventuellement les autres métaux. En effet, la limite de détection du plomb étant très haute (0.2%) seul l'échantillon de surface pouvait être analysé.

3.1 Identification des phases métalliques présentes dans le sol par microscopie électronique à balayage couplée à l'analyse chimique

Nous avons essayé d'identifier ces phases métalliques grâce à la microscopie électronique à balayage. C'est une technique basée sur le principe d'interaction matière-faisceau d'électrons pour déterminer la géométrie (micro-imagerie électronique) des phases étudiées. Lorsque le microscope est couplé à une sonde analytique (EDS), une analyse qualitative élémentaire (composition chimique) est possible. C'est une technique assez couramment utilisée pour l'étude des associations métalliques minérales (Juillot et al., 1998), qui permet de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon.

Par cette méthode, notre but était de pouvoir réaliser une identification qualitative et semi-quantitative des particules de sol contenant du plomb, avec l'obtention d'une micro-imagerie électronique.

3.1.1 Conditions expérimentales

L'échantillon de sol (0-10 cm), broyé et tamisé à 200 μ m est déposé sur une pastille en carbone, puis métallisé pour permettre la fixation de l'échantillon préalablement à l'analyse. La pastille

de carbone portant l'échantillon est observée grâce à un microscope Jeol LV JSM 6360, couplé à une sonde EDS (energy dispersive spectrometer). Ces observations ont été réalisées en collaboration avec T. Aigouy au **Laboratoire des Mécanismes et Transferts en Géologie (LMTG)** de Toulouse.

Une sonde électronique fine (faisceau d'électrons primaires générés par un filament en tungstène) est projetée sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre la sonde électronique et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond un signal électrique.

Un canon à électrons génère les électrons et une colonne électronique permet d'avoir un faisceau le plus fin possible, et une lentille électromagnétique permet de faire varier la distance focale et donc la taille du faisceau. En effet, la qualité de l'image dépend de la taille du faisceau.

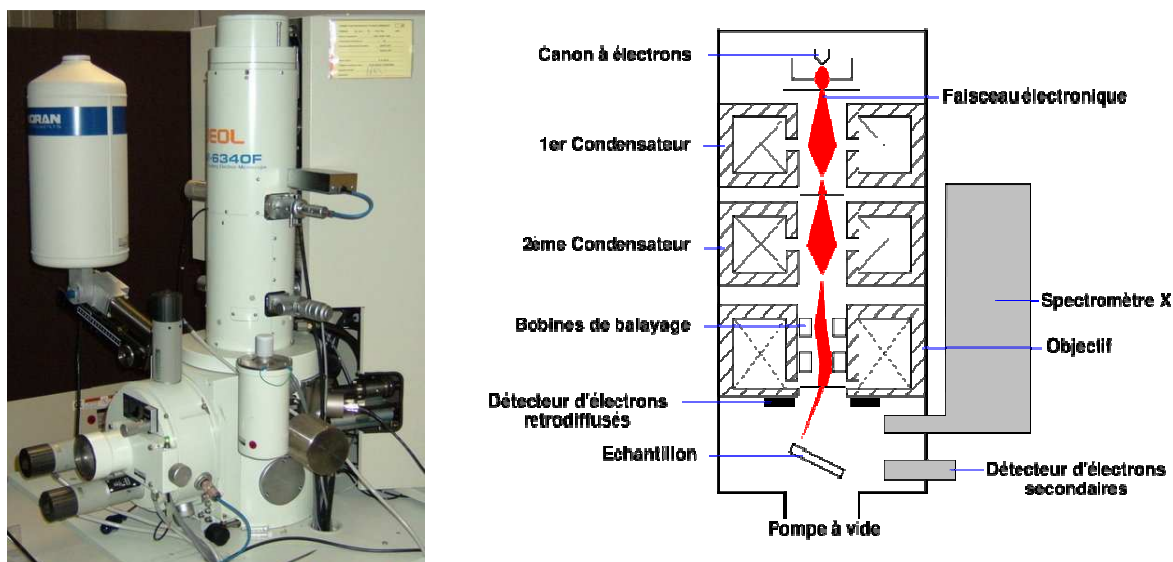


Figure 25 : Photographie et schéma d'un MEB

Deux sortes d'électrons sont détectés: les électrons secondaires et les électrons rétrodiffusés, qui sont des électrons incidents ressortant de la matière. L'observation en mode de détection des électrons rétrodiffusés fournit un contraste croissant en fonction du numéro atomique des éléments chimiques. Ceci fait ressortir les zones riches en métaux (Mn, Fe, Cu, Zn, Pb, Sb, Sn...) qui apparaissent plus brillantes que les éléments majeurs, plus légers (Al, Si, P, S...). L'analyse ponctuelle permet ensuite, à partir des spectres d'émission obtenus, de déterminer de façon qualitative l'environnement minéralogique du plomb.

Des micro-imageries (électrons rétrodiffusés) sont donc réalisées à différents endroits de la pastille. Elles vont nous permettre de connaître la distribution des éléments au sein de l'échantillon. Une cinquantaine de points ont été ainsi observés et analysés, les plus représentatifs sont présentés ci-dessous.

3.1.2 Résultats

Les différentes observations réalisées en microscopie électronique à balayage sur l'échantillon de surface ont permis de confirmer certaines des associations qui avaient été déterminées préalablement (chapitre I) grâce aux extractions séquentielles.

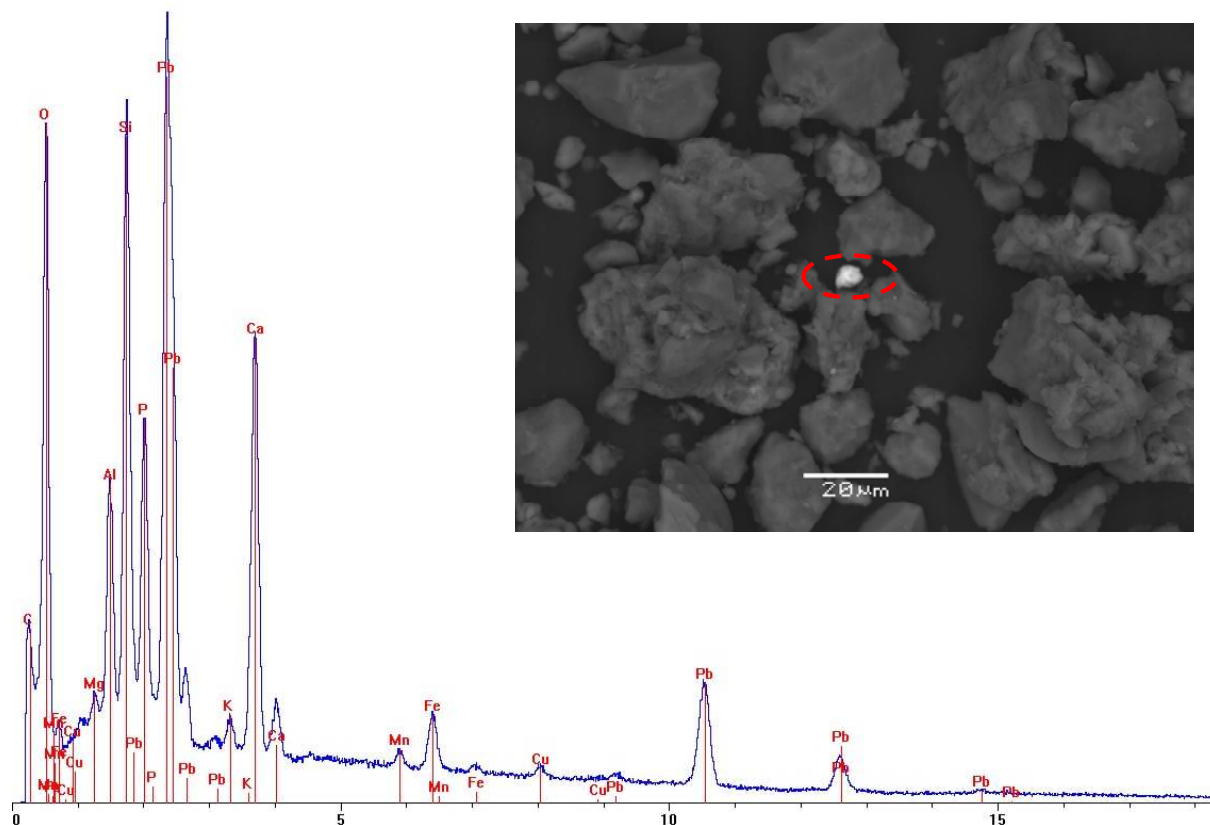


Figure 26 : Spectre EDS montrant le plomb associé aux phosphates, au calcium et à l'argile

Tout d'abord, les extractions séquentielles ont montré que le plomb était contenu en majorité dans la fraction acido-soluble, c'est-à-dire qu'il est principalement lié aux carbonates. Cependant, cette fraction est également susceptible de contenir des phosphates. Les éléments relevés sur la Figure 26 semblent confirmer cette hypothèse. En effet, on observe sur le spectre EDS un gros pic de plomb, accompagné d'importants pics de calcium et de phosphore. Cependant, sur la cinquantaine de points analysés, celui-ci est le seul où Pb a été détecté à proximité d'un phosphate. On note également la présence d'un alumino-silicate (argile).

Les extractions séquentielles ont également montré qu'une partie importante du plomb est liée aux oxydes métalliques, de manganèse et surtout de fer. Ces associations ont également pu être confirmées par la microscopie électronique à balayage. En effet, comme le montre la Figure 27, le plomb est ici associé à du manganèse et à du fer, toujours en présence d'argile.

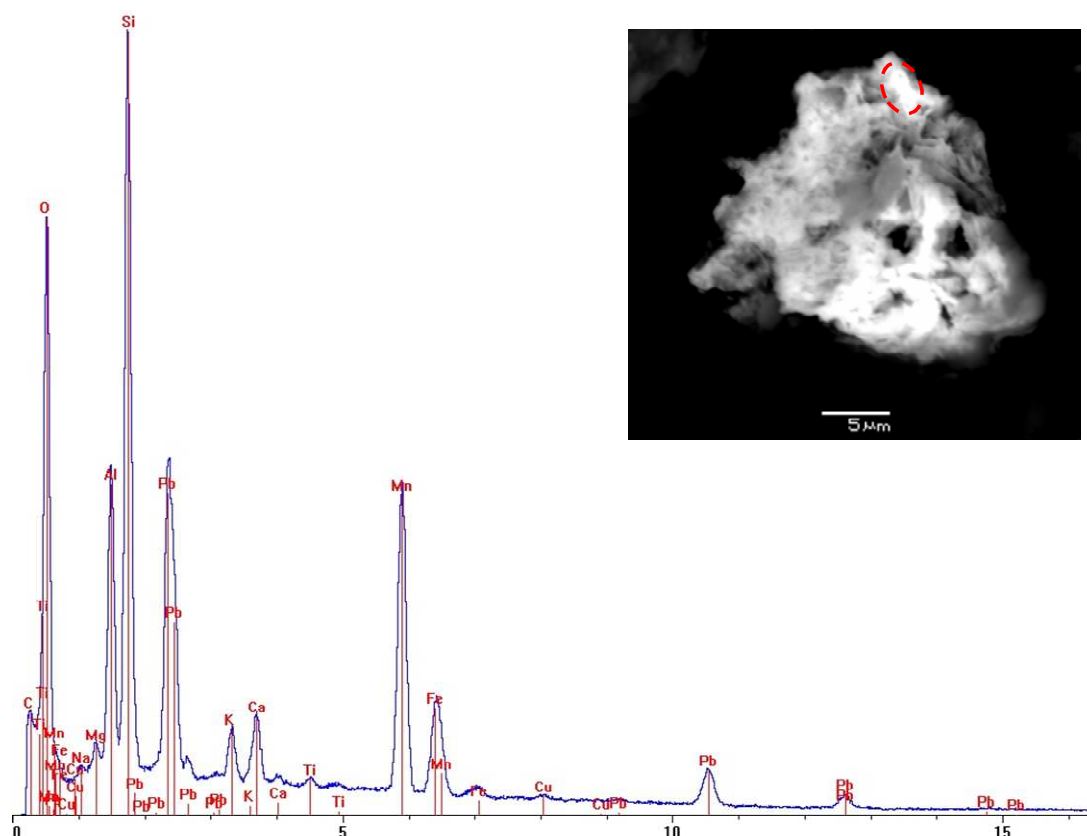


Figure 27 : Spectre EDS montrant le plomb associé au fer, au manganèse et à l'argile.

L'analyse du profil du sol, en particulier grâce aux extractions à l'eau régale confirmées par les attaques totales à l'HF ont également montré qu'en plus de la contamination au plomb, d'autres métaux étaient présents en concentrations anormales. Ce sont des métaux qui sont impliqués dans le processus de recyclage de l'usine, et qui du coup ont contaminé le sol de surface en même temps que le plomb. Ces métaux sont surtout l'étain et l'antimoine, puis dans une moindre mesure, le cuivre, le zinc et l'arsenic. Les différentes images réalisées grâce au MEB nous ont permis de mettre en évidence la présence de ces métaux entraînant la contamination du sol (Figure 28). Cette même figure montre également la présence de fer dans la même zone.

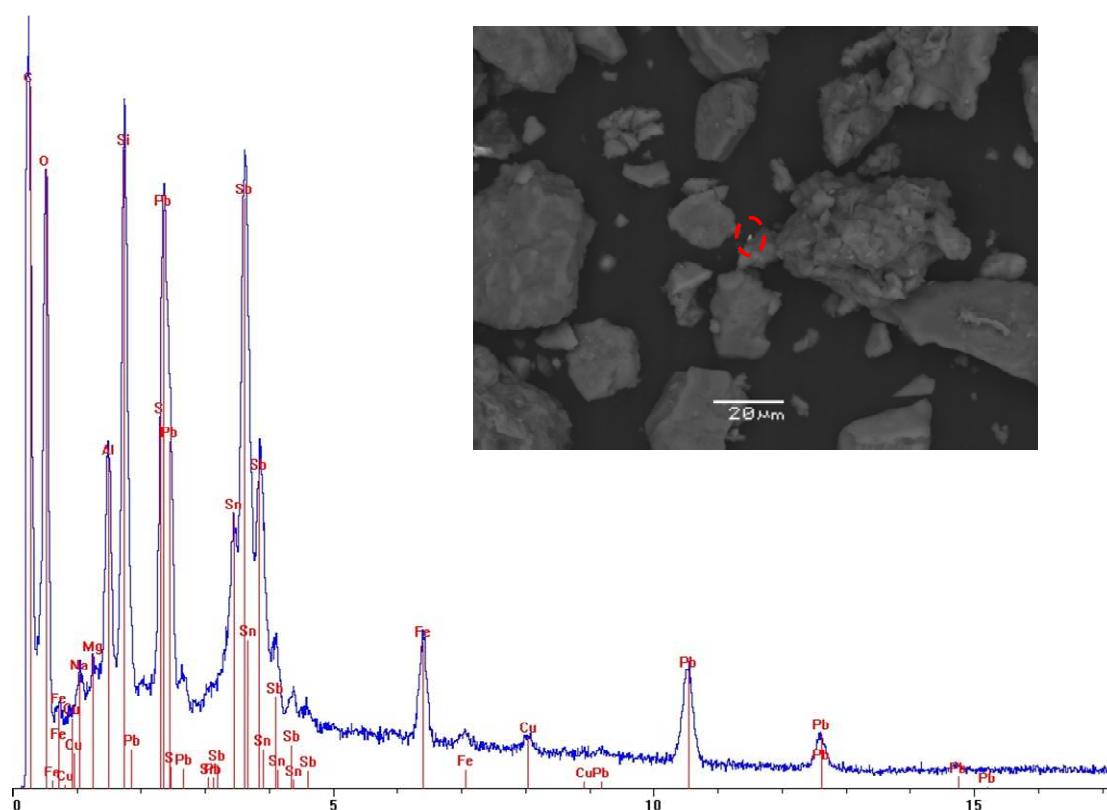


Figure 28 : Spectre EDS montrant Pb associé à Sb, Sn, Fe, Cu et à l'argile

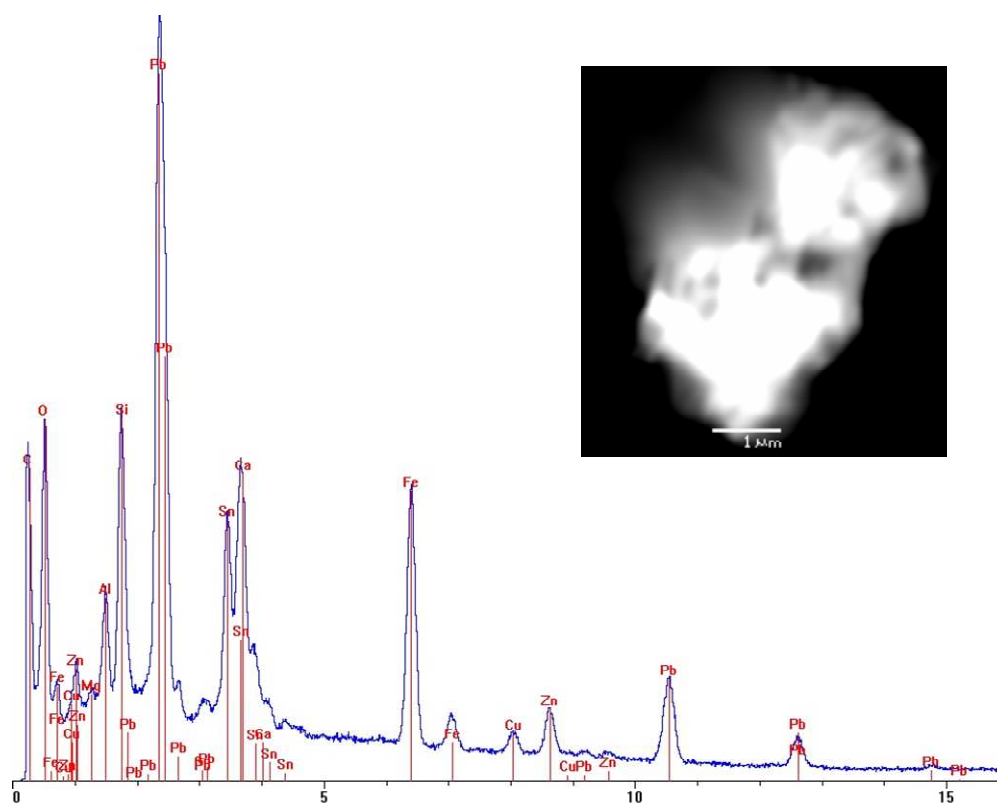


Figure 29 : Spectre EDS montrant Pb associé à Sn, Fe, Cu, Zn et à l'argile

La Figure 29 montre l'ensemble des associations que l'on a pu voir lors des diverses analyses chimiques. En effet, on peut voir sur le spectre EDS que dans cette zone de la pastille, en plus du plomb, on trouve la plupart des métaux pour lesquels nous avons mis en évidence une contamination, tels que Zn, Cu, Sn.

La Figure 27, la Figure 28 et la Figure 29 montrent les spectres les plus fréquemment relevés. Sur la cinquantaine d'observations, le plomb est associé à l'antimoine (Figure 28) et à l'étain (Figure 29) dans plus de 50% des cas. Les associations Pb-Zn et Pb-Cu sont plus rares et ne sont visibles que dans environ 10% des observations ce qui confirme la contamination plus faible en cuivre et zinc de ce profil.

L'intérêt de cette méthode d'investigation est d'identifier les constituants porteurs de métaux au sein du sol. Ceci nous a permis de visualiser l'environnement du plomb. Cependant, même si des zones très riches en plomb ont été identifiées, associées à des éléments tels que O, Si, Fe ou Mn, la détermination d'une espèce minéralogique précise n'est pas possible par cette technique. C'est pourquoi il est intéressant de réaliser également des analyses en microsonde électronique. Une autre limite aux observations en MEB-EDS réalisées est la représentativité des résultats obtenus par l'analyse d'une petite portion de sol. C'est pourquoi il est judicieux de coupler ces techniques aux observations pédologiques et analyses chimiques pour lesquelles des répliques ont été effectuées.

3.2 Composition chimique des phases présentes dans le sol, identifiée par microsonde électronique.

Les analyses par microsonde apportent des informations quantitatives sur la composition chimique des phases minérales auxquelles le plomb se trouve associé. L'analyse de la composition des phases identifiées précédemment permet de compléter l'approche ponctuelle réalisée au MEB. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec P. de Parseval au **Laboratoire des Mécanismes et Transferts en Géologie (LMTG)** de Toulouse.

3.2.1 Conditions expérimentales

La **microsonde** est une méthode d'analyse élémentaire inventée en 1951. Elle consiste à bombarder un faible volume d'échantillon ($10\text{ }\mu\text{m}^3$) avec un faisceau d'électrons fortement accélérés et à analyser le spectre des rayons X caractéristique émis par l'échantillon pour connaître les éléments présents dans ce faible volume.

Un photon est généré après le bombardement de l'échantillon, qui émet une énergie ($h\nu$), caractéristique des transitions électroniques de l'atome bombardé et donc de sa nature chimique.

Un schéma de la microsonde est présenté en Figure 30. Une sonde électronique est formée en réduisant une source d'électrons par deux ou trois lentilles magnétiques. Les électrons frappent l'échantillon à analyser avec une énergie d'impact qui peut varier de quelques centaines d'eV jusqu'à 50 keV. Les photons X émis par l'échantillon sous l'impact des électrons sont analysés par les spectromètres à rayons X.

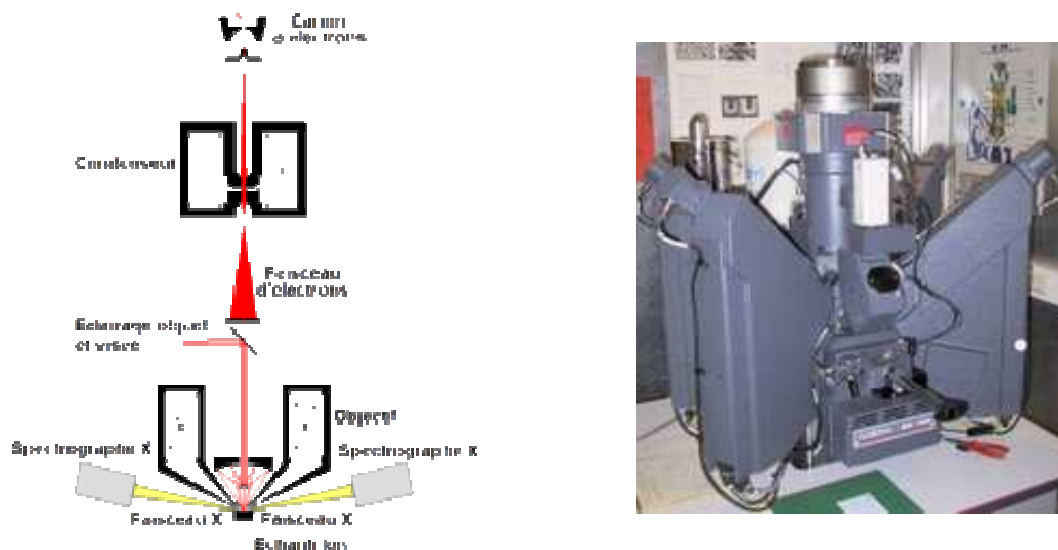


Figure 30 : Schéma et photographie de la microsonde

3.2.2 Analyses

Seul l'échantillon de surface du sol (0-10 cm) a été étudié. Le programme d'analyse comprenait les éléments majeurs (Na, Mg, Al, Si, K, Ca, Mn, Fe), P, S, et les traces (Zn, As, Pb, Sn, Sb), afin de pouvoir évaluer la nature minéralogique de la zone examinée.

L'échantillon de sol broyé et tamisé cette fois à 2mm a d'abord subi une inclusion dans de la résine, afin de pouvoir réaliser des coupes de dimension (3.5 x 2.6 cm) déposées sur des lames qui sont ensuite polies. Ces lames minces ont été confectionnées par Y. Bénard de l'**UMR Sol Agronomie et Spatialisation** de l'INRA de Rennes.

Avant de passer la lame au MEB ou la microsonde, des observations à la loupe binoculaire ont permis d'obtenir une vue générale de la lame (Figure 31) de manière à pouvoir s'y repérer. Puis dans une étape préliminaire, la lame a été observée au MEB à un faible grossissement (x30) qui nous a permis de balayer la totalité de la lame, et de photographier un total de 80 pages, ceci afin d'y détecter des points minuscules très blancs. Ces points sont ceux sur lesquels les analyses à la microsonde sont ciblées, car ce sont les zones les plus susceptibles de contenir du plomb. De tout ce travail, nous avons retenu ici les six pages les plus intéressantes.

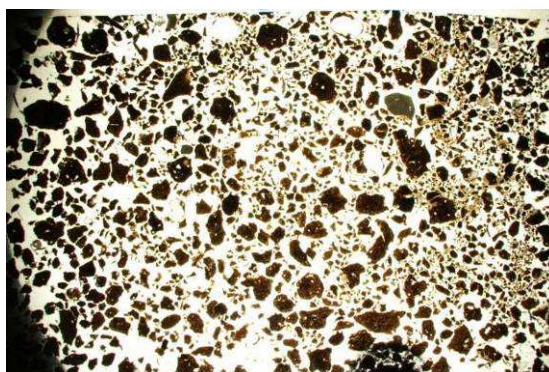


Figure 31 : Vue générale de la lame mince (3.5 x 2.6 cm) de l'échantillon 0-10cm observée à la loupe binoculaire

3.2.3 Résultats obtenus

Les résultats de l'analyse pondérale sont rassemblés dans le Tableau 13. Les zones étudiées sont numérotées selon leur position sur la lame observée au MEB. Elles comportent généralement plusieurs points d'analyse, également référencés.

Deux stratégies d'observation ont été suivies :

- Dans les zones 6 ; 42 et 51 plusieurs points d'analyse ont été réalisés sur un même grain dans lequel la composition minéralogique est à peu près constante. Cependant, la répartition du plomb y est variable. Des cartographies permettent de visualiser les associations entre le plomb et les autres éléments (Figure 35, Figure 37, Figure 39).
- Dans la zone 3 (Figure 32) plusieurs points brillants dispersés dans différents agrégats ont été analysés. Chacun de ces grains a une composition minéralogique qui lui est propre. Dans le point 1, le composant prépondérant est la silice. La teneur en Si est de 46% (Tableau 13), la silice pure en contient 47%. On remarque que peu de plomb se retrouve associé à ce point (0.3% Pb). On trouve également 2 points composés principalement d'oxydes de titane (TiO_2), les points 3 et 5, surlignés en jaune dans le Tableau 13. Ils contiennent 60 et 53% de Ti, TiO_2 en contient 60%. Ces 2 points sont associés à moins de 1% de plomb, qui est probablement du plomb issu du fond géochimique.

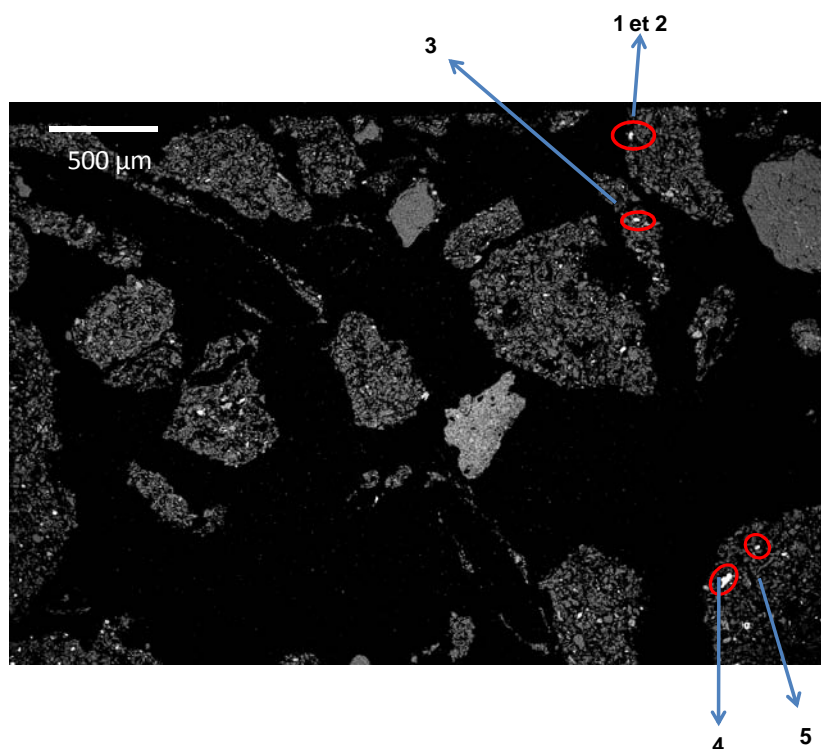


Figure 32 : Image de la zone 3 obtenues en MEB, et localisation des 5 points d'analyses

PARTIE III : Comportement du plomb le long du profil du sol

Image	Zone	Points	% recalculé	% de poids d'élément mesuré par la microsonde															
				O	Na	Mg	Al	Si	P	S	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Zn	As	Sn	Sb
34	3	1	52.11	0.06	0.00	0.00	45.60	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.06	0.15	0.01	0.00	0.05	0.00	0.32
		2	19.17	0.01	0.30	3.47	8.97	0.20	0.05	1.08	6.06	0.32	0.64	5.14	0.00	0.00	0.00	0.03	0.92
		3	40.95	0.06	0.00	0.18	0.45	0.00	0.00	0.04	0.04	59.76	0.03	0.61	0.03	0.04	0.00	0.03	0.16
		4	29.32	0.23	0.64	7.08	13.47	0.04	0.04	1.61	0.94	0.32	7.50	6.76	0.29	0.00	0.12	0.29	11.58
		5	40.30	0.00	0.09	0.30	3.44	0.04	0.01	0.05	0.12	53.10	0.01	1.01	0.00	0.01	0.00	0.05	0.00
37	51	1	28.04	0.00	0.65	6.07	11.78	0.02	0.05	1.17	1.09	0.07	16.98	4.59	0.00	0.00	0.03	0.07	13.49
		2	20.92	0.18	0.00	1.16	12.54	0.00	0.07	2.09	0.64	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	8.38	0.00	31.26
		3	30.18	0.38	0.00	2.39	16.54	0.00	0.14	2.13	0.59	0.00	0.08	0.20	0.00	0.04	23.14	0.08	23.63
		4	50.80	0.12	0.02	0.50	43.34	0.00	0.02	0.51	0.21	0.00	0.05	0.04	0.00	0.00	0.14	0.00	8.22
		5	17.79	0.13	0.01	0.99	10.86	0.03	0.00	2.23	0.66	0.00	0.08	0.30	0.42	0.00	2.95	0.03	34.66
		6	31.03	0.53	0.07	2.76	21.94	0.04	0.05	1.52	0.58	0.06	0.00	0.49	0.08	0.00	3.16	0.00	20.26
		7	33.38	0.56	0.03	2.63	23.91	0.00	0.00	1.78	0.65	0.03	0.01	0.23	0.00	0.01	3.10	0.16	25.51
		8	22.82	0.18	0.56	4.97	11.94	0.05	0.03	1.10	0.65	0.15	0.02	3.05	0.00	0.00	7.46	0.08	4.15
35	6	1	29.52	0.00	0.28	3.59	14.63	0.50	0.09	0.64	1.20	0.11	6.04	13.75	0.12	0.00	0.06	0.10	3.61
		2	24.43	0.10	0.42	5.31	8.56	0.43	0.07	0.84	1.16	0.94	5.92	13.34	0.08	0.00	0.00	0.00	3.15
		3	25.00	0.03	0.23	4.24	6.34	0.42	0.06	0.37	1.26	0.21	13.08	18.52	0.00	0.04	0.04	0.16	8.59
		4	19.82	0.07	0.33	3.42	6.48	0.07	0.00	0.52	0.85	0.05	16.38	4.89	0.04	0.00	0.00	0.21	21.46
		5	16.28	0.01	0.13	1.86	3.78	0.28	0.01	0.44	1.06	0.13	16.05	6.45	0.05	0.10	0.12	0.34	21.56
39	42	1	30.86	0.02	0.40	5.15	16.22	0.05	0.05	1.19	0.66	0.16	9.41	7.34	0.09	0.00	0.05	0.31	10.13
		2	23.08	0.01	0.00	0.07	1.11	0.10	0.14	0.04	0.40	0.00	0.30	46.72	0.03	0.11	0.10	0.91	10.79
		3	21.69	0.09	0.26	2.36	5.49	0.13	0.12	0.37	0.69	0.05	1.30	25.54	0.05	0.17	0.11	0.91	10.16

Tableau 13: Composition chimique des différents points d'analyse de la microsonde. Les zones de nature minéralogique homogène sont surlignées de couleur. Les numéros de points soulignés ont fait l'objet d'une cartographie des éléments.

Pour de plus fortes teneurs en plomb trouvée par la microsonde (entre 10 et 30%), il se présente 2 cas de figure différents :

- Soit le plomb est associé aux oxydes de fer et de manganèse et parfois d'aluminium (point surlignés en rouge)
- Mais les plus fortes teneurs en plomb sont le plus souvent associées à un autre minéral, riche en silice et contenant autour de 2% de potassium. Pour ces points, plus il y a de potassium, plus il y a de plomb, comme le montre la Figure 33.

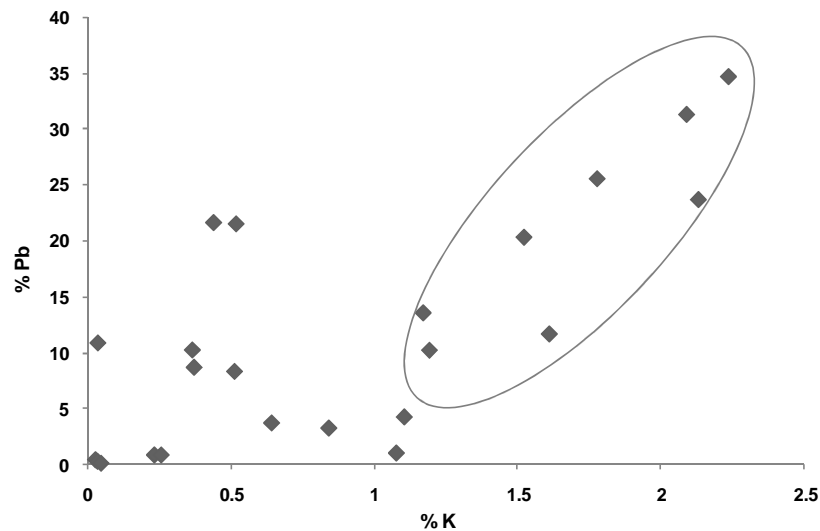


Figure 33 : Corrélation entre les teneurs en potassium et celles en plomb dans tous les points d'analyse.

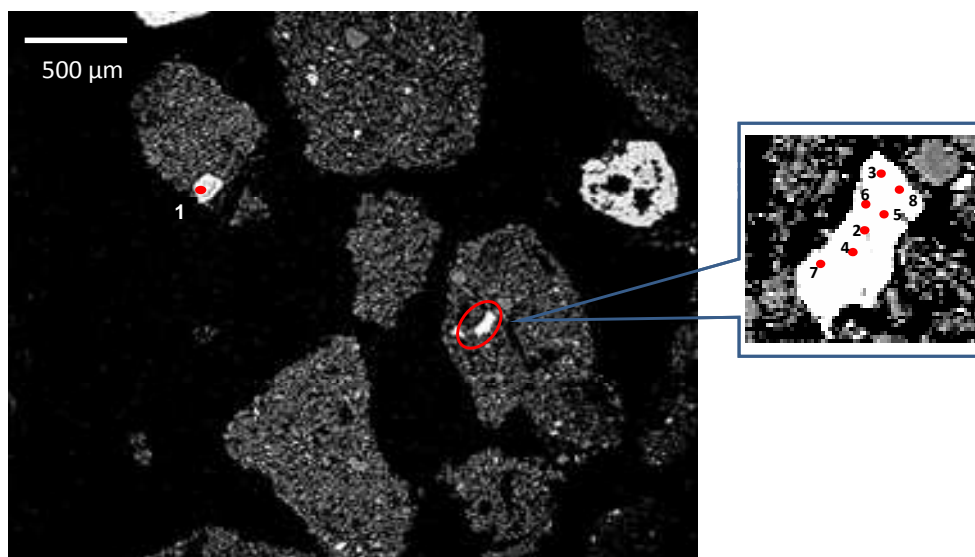


Figure 34 : Image de la zone 51 obtenues en MEB, et localisation des points d'analyses, avec un agrandissement du grain où s'est concentrée l'analyse (cartographies ci-dessous)

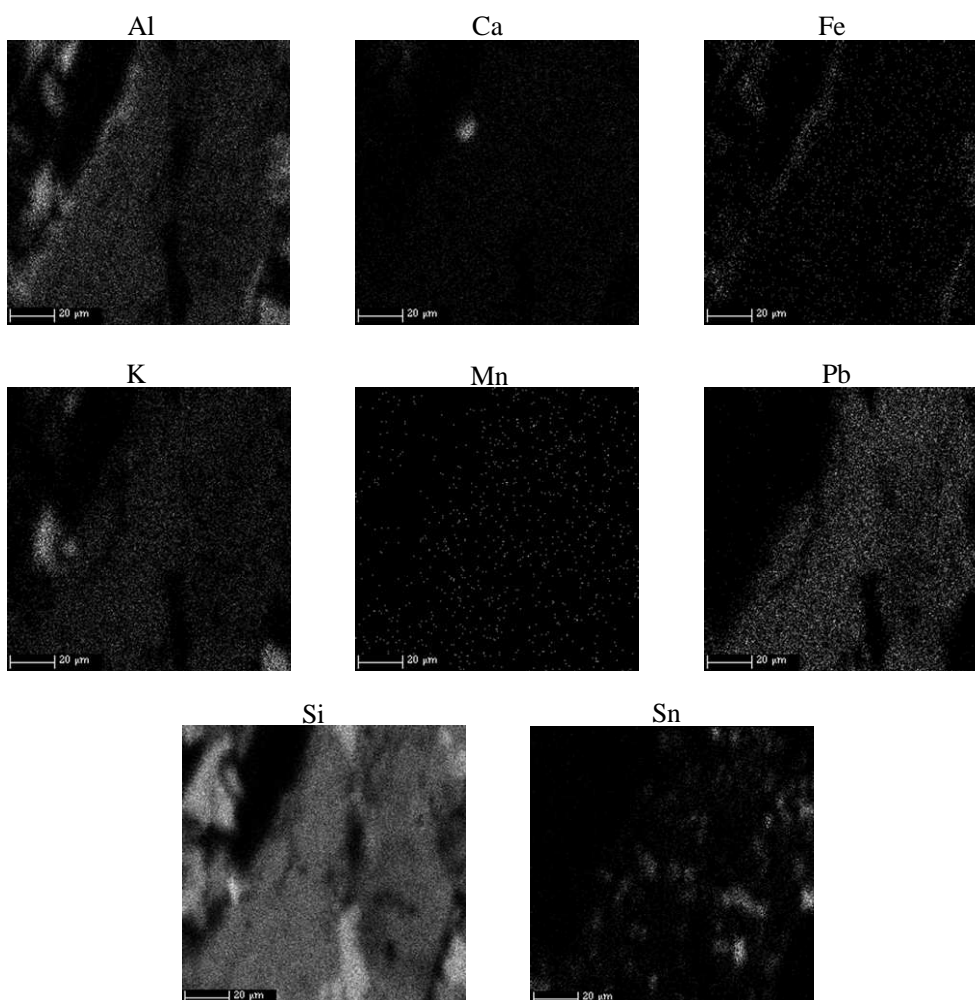


Figure 35 : Cartographie de la zone 51 réalisée en microsonde, sur le grain central riche en silice et argile (concentrations croissantes du noir au blanc)

Dans la zone 51, le premier point d'analyse (Figure 34) est situé sur un petit grain bien brillant, isolé dans un grain contenant 17% de manganèse, 6% d'aluminium, 12% de silice et 13.5% de plomb. Ce point paraît donc être un oxyde manganèse, au sein d'un agrégat. Le plomb semble auréoler le grain d'oxyde de Mn, car c'est en bordure du grain que l'examen à la microsonde donne les plus fortes teneurs.

L'autre grain zoomé dans la Figure 34, localisé dans la partie centrale d'un autre agrégat contient la majorité des points d'analyse (de 2 à 8). Il semble être majoritairement composé d'argile (silicate d'aluminium) et de silice, dans lesquelles on retrouve les concentrations en plomb les plus élevées, avec notamment les points 2, 3, 5, 6 et 7, qui contiennent entre 24 et 35% de plomb. Dans cette zone, nous avons retrouvé une corrélation positive avec le potassium (Figure 33) sans clairement identifier la nature de ce minéral. De plus, on peut noter dans cette zone la présence de 3 points présentant des concentrations assez élevées en étain : les points 2 et 8 contiennent autour de 8% d'étain, le point 3 en contient plus de 23%.

Une cartographie a également été réalisée sur cette zone, les résultats étant présentés sur la Figure 35. Là encore, les images de la cartographie confirment les premières constatations suite à l'analyse chimique. C'est un grain composé globalement d'argile (silicate d'aluminium), probablement de l'illite (argile majoritaire dans ce sol, identifiée par diffraction des rayons X). On constate que le plomb est mal corrélé au fer et au manganèse (les zones brillantes ne correspondant pas), alors qu'il est bien corrélé au potassium, et dans une moindre mesure à l'aluminium.

La zone 6, présente un gros grain central bien blanc visualisé au MEB (Figure 36). Le passage en microsonde, a montré pour cette zone beaucoup de plomb sur le bord droit du grain blanc. Les points 1 et 2 sont composés de 3% de Pb, le point 3 de 8.6%, enfin les points 4 et 5 sont ceux présentant la plus grande quantité de plomb, avec environ 21%. Tous ces points riches en plomb sont vraisemblablement associés à des oxydes de fer et de manganèse (au vu des fortes concentrations retrouvées en Fe et Mn) (points 1 à 5, Tableau 13).

La cartographie réalisée ensuite sur ce grain brillant (Figure 37) confirme les résultats présentés précédemment. En effet, on constate sur ces images que le plomb est bien corrélé avec le fer et le manganèse (les zones plus brillantes sont situées au même endroit pour les 3 éléments), mais également avec le calcium, même si les concentrations en calcium retrouvées ne sont pas très élevées. On peut également constater sur ces images que le silicium a un comportement inverse, en effet, les zones où on retrouve le Si sont celles où le plomb n'apparaît pas. Concernant l'aluminium, il est relativement bien corrélé au plomb dans la partie droite du grain, par contre il est plutôt corrélé à la silice dans la partie gauche du grain.

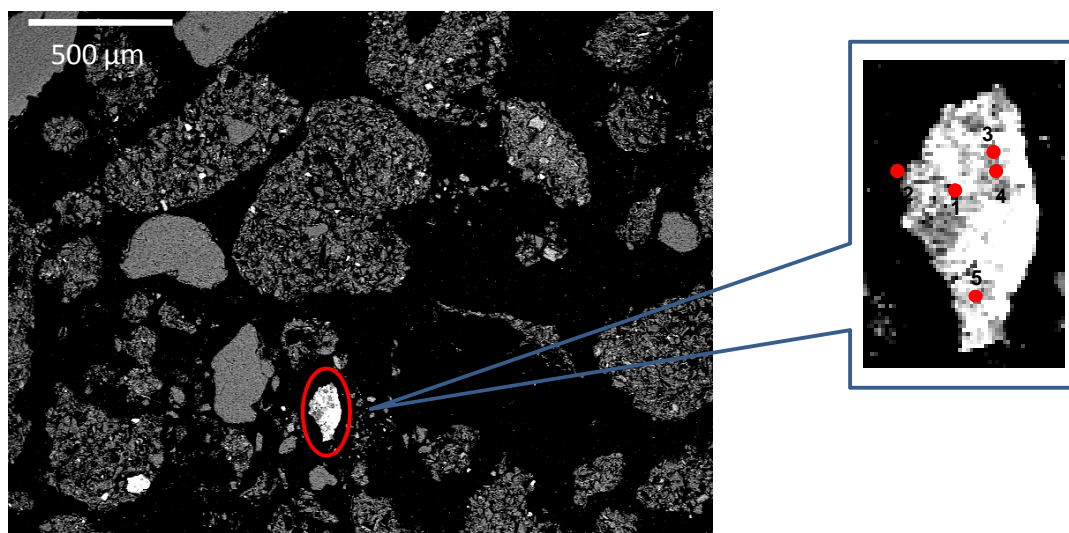


Figure 36 : Image de la zone 6 obtenues en MEB, et localisation des 5 points d'analyses

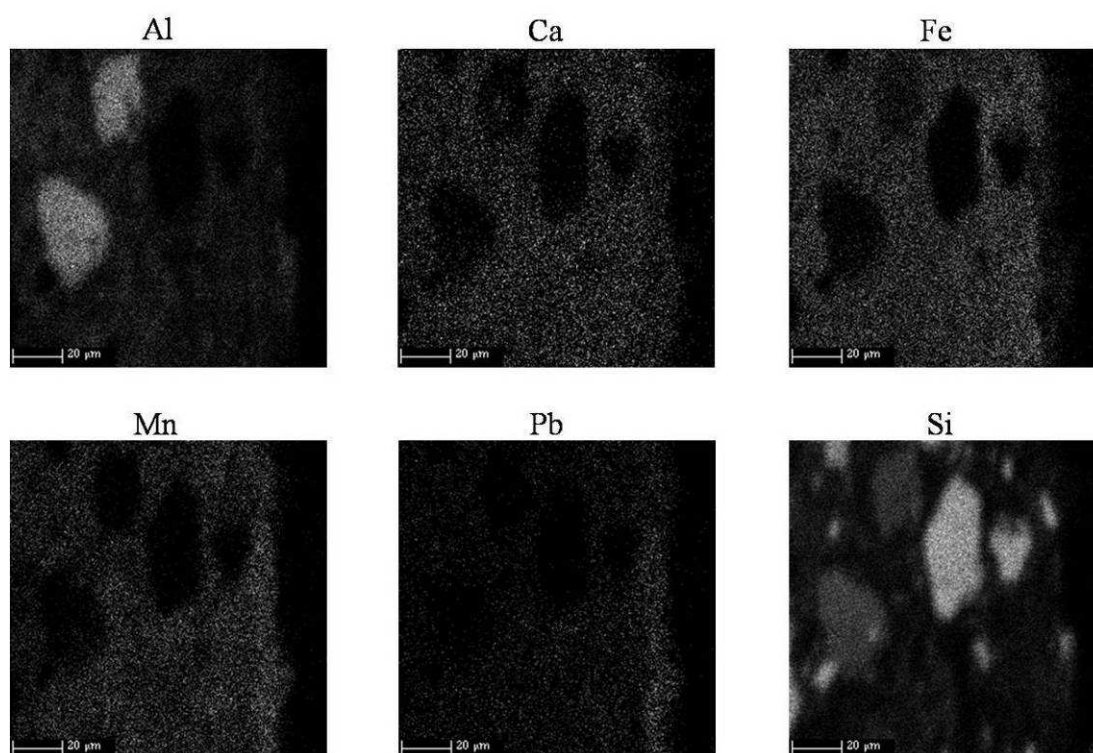


Figure 37 : Cartographie de la zone 6 réalisée en microsonde, avec des concentrations croissantes du noir au blanc.

Enfin la zone 42 est présentée sur la Figure 38. Les 3 points analysés contiennent autour de 10% de plomb, associé surtout à du fer et du manganèse (Tableau 13). On peut donc conclure ici aussi à une association du fer avec les oxydes (de fer et de manganèse).

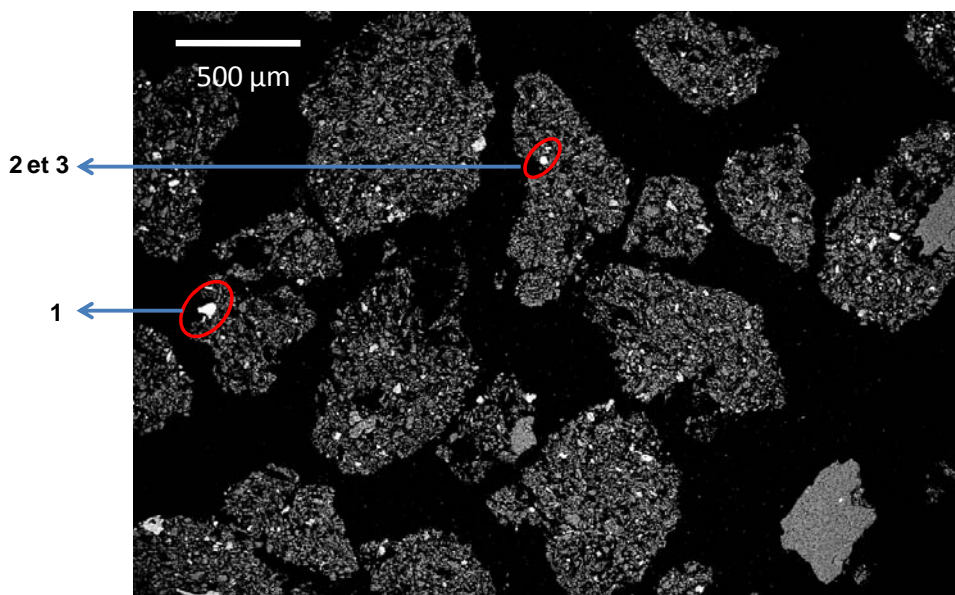


Figure 38 : Image de la zone 42 obtenues en MEB, et localisation des 3 points d'analyses

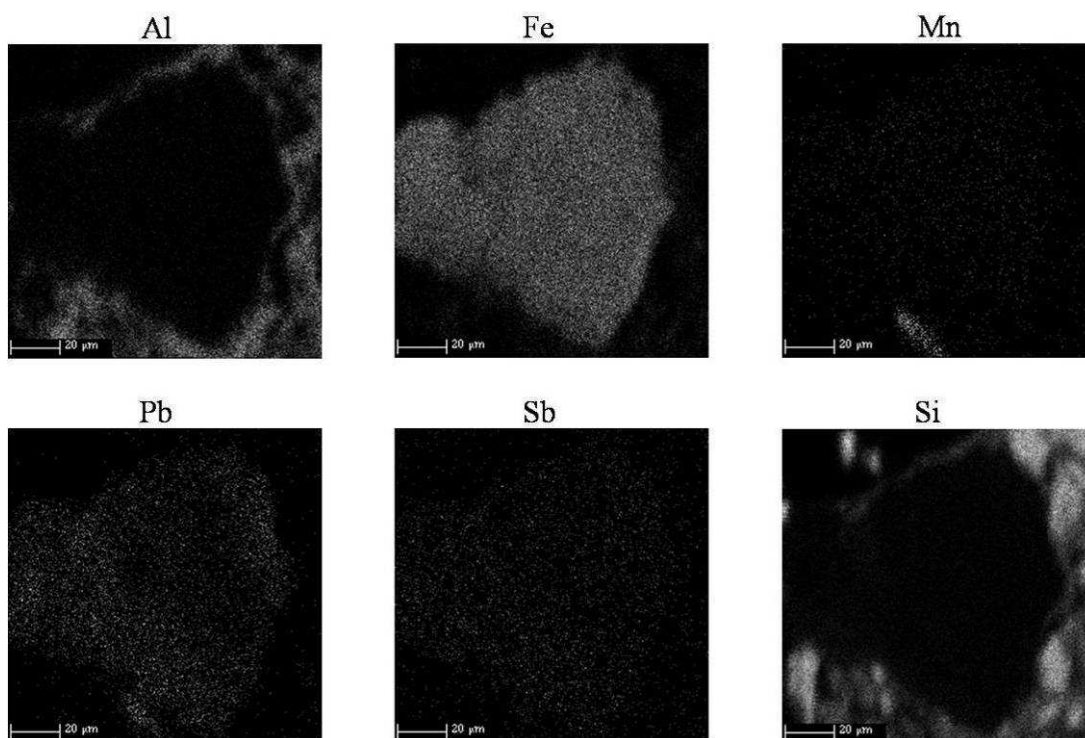


Figure 39 : Cartographie de la zone 42 réalisée en microsonde au niveau du point 1

Cette zone a également fait l'objet d'une cartographie (Figure 39).

Dans le grain 1, les métaux ont été cartographiés (Figure 39). Là encore, les fortes teneurs en plomb coïncident avec celles du fer. Cette corrélation est moins nette pour le manganèse, mais reste observable. De plus, on peut également remarquer la bonne corrélation du fer avec l'antimoine, même si ce dernier n'est pas en concentration très élevée dans ce point (0.3%). Ce grain semble recouvert d'argile. À l'intérieur, il est constitué d'oxyde de fer auquel est associé le plomb, l'antimoine et le manganèse.

Les analyses par microsonde des zones denses repérées sur l'échantillon de sol de surface ont donc mis en évidence de fortes proportions de plomb associé à des oxydes de Fe, Mn et aux argiles. Ces associations seraient majoritaires par rapport à des associations avec les phosphates mais on peut également imaginer que des phosphates de plomb de taille inférieure au micron n'ont pas été mis en évidence par cette technique. Le faisceau prospectant les échantillons dans un volume unitaire de $10\ \mu\text{m}^3$, il ne permet pas une analyse de la totalité de la lame. Les points analysés ont été pré-sélectionnés, cependant, des zones non analysées pourraient contenir des phosphates de plomb. De plus le carbone des carbonates ou des matières organiques n'est pas analysé par cette technique et les observations réalisées de façon aléatoire n'ont pas de caractère statistique. En bref ces résultats de microsonde apportent des informations limitées dans ce cas mais parfaitement cohérentes avec ceux obtenus par les autres approches mises en œuvre.

Finalement, les résultats montrent que le plomb est souvent associé aux oxydes de fer et de manganèse, comme nous l'avons déjà observé en MEB. Nous avons également observé que les plus fortes concentrations en plomb ont été retrouvées dans un minéral contenant autour de 2% de potassium. Les résultats donnés par l'analyse chimique montrent au niveau de ces points riches en plomb et en potassium, un ratio Pb/K constant et égal à environ 20. Ceci signifierait une molécule composée de 4 atomes de plomb pour un de potassium. Puisque les extractions séquentielles indiquent que le plomb anthropique est majoritairement sous forme de carbonates, il pourrait s'agir d'un double carbonate de plomb et de potassium mélangé à des argiles et du quartz, d'une formule proche de $(\text{Pb}_4\text{K})_2(\text{CO}_3)_9$. Malheureusement, ce carbonate n'a jamais été cité dans la littérature et il ne nous a pas été possible d'identifier ce minéral plus précisément. Le fait d'avoir un sol contaminé peut entraîner la formation de composés néoformés avec l'arrivée du plomb. Ce phénomène a été observé par Leguedois et al. (2004), dans un sol agricole fortement contaminé par une usine métallurgique. Les auteurs ont mis en évidence des composés riches en fer et en métaux, qui ne se forment qu'en conditions particulières de sol agricoles fortement contaminés : l'alternance d'horizons peu perméables et fortement perméables, une solution du sol saturée en métaux et la présence de fertilisants.

Conclusion

Les résultats de l'approche pédologique combinés à des méthodes d'investigation supplémentaires nous ont permis de mettre en évidence tout d'abord une contamination par le plomb. De très fortes concentrations sont retrouvées en surface, accompagnées d'une migration du plomb le long du profil jusqu'à une profondeur de 50 à 60 cm.

L'approche par les extractions séquentielles a permis de distinguer 2 zones dans le profil. Une zone très fortement influencée par l'activité de l'usine (0-60cm), et une zone moins touchée (60-130cm). Le plomb anthropique est majoritairement lié aux carbonates (dans les 50 premiers centimètres, la majorité du plomb est extraite dans la fraction acido-soluble), alors que le plomb naturel semble plutôt lié aux oxydes de fer (la majorité du plomb étant extraite dans la fraction réductible, avec une bonne corrélation entre les concentrations en Pb et celles en Fe_2O_3). De plus, les analyses chimiques ont montré que le plomb n'est pas le seul métal présent en concentrations anormales dans ce sol. En effet, des concentrations élevées en antimoine, étain, ont été relevées, mais aussi en cuivre, zinc et arsenic, dans une moindre mesure, comme l'ont confirmé les observations au MEB. Ces métaux là sont quant à eux majoritairement liés aux oxydes de fer.

L'approche isotopique confirme tous ces résultats. En effet, entre 0 et 60 cm, on a bien une zone très fortement contaminée par l'activité de l'usine puisque les rapports isotopiques de ces horizons se rapprochent de ceux trouvés par Véron et al (1999) autour de l'usine Métaleurop. Ceci est également confirmé par un facteur d'enrichissement très élevé surtout en surface (de 36 dans l'horizon 0-10 cm à 2 à 50 cm). Le calcul du pourcentage de plomb anthropique permet de montrer la présence presque exclusive de plomb anthropique dans ces niveaux. En dessous de 60 cm, nous avons déterminé par approche chimique un changement de comportement du plomb. En effet, le plomb initialement présent dans la fraction acido-soluble semble plutôt lié au fer à partir de 60 cm (Cecchi et al, 2008). L'analyse isotopique a montré que les ratios isotopiques augmentaient vers la profondeur, signe que l'on se rapproche du plomb endogène (Monna et al, 1997 ; Véron et al, 1999). Ceci a été confirmé par le facteur d'enrichissement qui chute fortement dans cette zone, se rapprochant progressivement de 1. Cependant le pourcentage de plomb anthropique, calculé en référence au thorium, montre que la contribution de l'usine est encore présente, même si elle l'est nettement moins qu'en surface.

Cette étude a donc permis de montrer principalement que les sols environnant cette usine de recyclage du plomb présentaient une contamination multi métallique (Pb, As, Cu, Zn, Sb et Sn). Des résultats similaires ont été trouvés par différents auteurs ayant travaillé sur les usines de recyclage du plomb. Cardner et al. (1999) ont mis en évidence des corrélations entre Pb et As ou Sb près d'une usine de Los Angeles. Chatterjee and Banerjee (1999) ont également démontré des corrélations significatives entre Pb et As, Sn et Zn près d'une usine de Calcutta. Ces contaminations multi-métalliques peuvent être expliquées par le processus de recyclage du plomb. Les batteries usagées sont vidées puis broyées en petit morceaux. Les scories de rupture de batteries sont alors riches en différents métaux (PbO , PbSO_4 , As, Cu, Sb, Sn) et une phase de réduction permet d'isoler le plomb

métallique. Ce plomb brut est souvent fortement contaminé par les autres métaux, et doit donc subir une phase d'affinage. Le plomb brut est fondu, puis des réactifs sont ajoutés successivement pour éliminer spécifiquement les métaux inutiles (Figure 40).

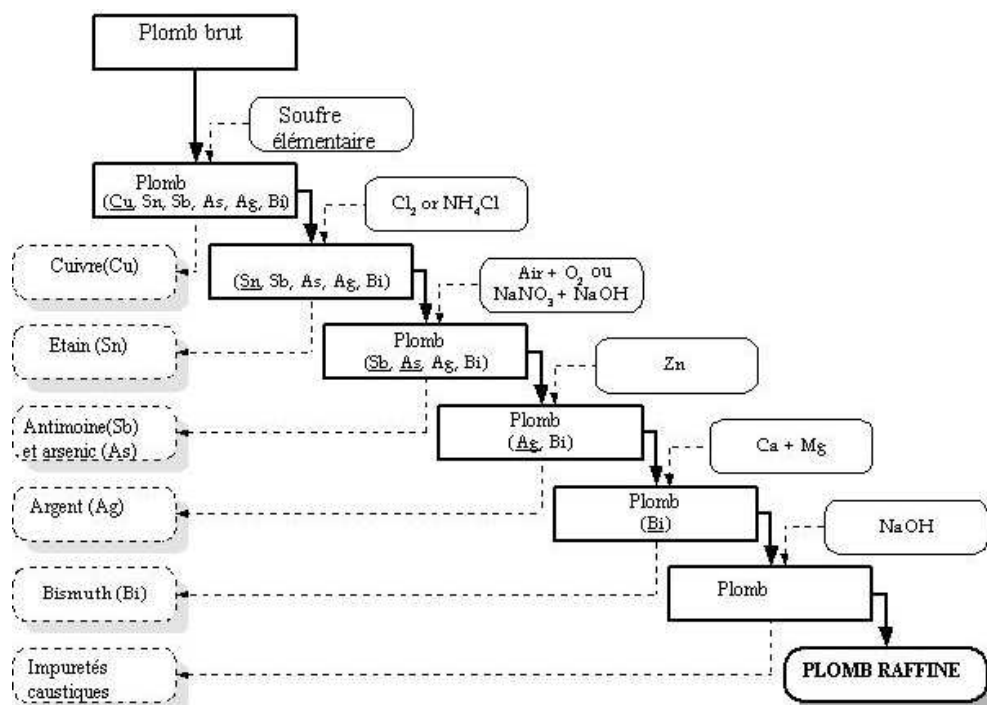


Figure 40 : Procédé d'affinage du plomb (d'après le programme des nations unies pour l'environnement)

Les différents métaux polluant le plomb sont donc éliminés par étapes successives, mais cette phase d'affinage peut représenter des risques pour l'environnement. Lors de la montée en température pour faire fondre le plomb, il peut y avoir des émissions de vapeurs de plomb ou d'acide sulfurique. Mais surtout, l'élimination des métaux non désirés lors de cette phase peut provoquer une contamination. En effet, les scories de la cuve d'affinage se présentent sous forme de poussières très fines et sèches ayant une forte teneur en plomb et en autres métaux.

Cette étude détaillée du plomb le long du profil du sol nous a permis de répondre à plusieurs questions, notamment concernant l'étendue de la contamination, ainsi que sa migration vers la profondeur. Les extractions séquentielles ont également permis de mettre en évidence des fractions hydrosolubles et échangeables assez élevées dans le sol de surface (4,2 mg.kg⁻¹ dans l'horizon 0-10 cm). Cependant, comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, l'étude des concentrations en plomb n'est pas suffisante pour évaluer sa mobilité potentielle, et donc le risque qu'il représente pour l'environnement. Les meilleurs outils pour étudier le transfert des métaux vers les êtres vivants sont les êtres vivants eux-mêmes. C'est pourquoi il est important de mettre en place des expériences de transfert du sol contaminé vers un organisme donné. La suite de ces travaux est donc consacrée à l'étude du comportement du plomb dans le système sol-plante, en utilisant le sol étudié dans cette partie, ainsi que 2 types de végétaux, la fève (*Vicia faba*) et la tomate (*Lycopersicon esculentum*).

PARTIE IV : Etude du transfert sol-plante

Cette partie est essentiellement composée d'une publication soumise à la revue
« Environment International », intitulée :

**Fate of lead in the soil-plant system of *Vicia faba* and
Lycopersicon esculentum cultivated on a contaminated calcareous
soil.**

M. Cecchi, M. Guiresse, J. Silvestre, P. Winterton and C. Dumat

1 Introduction

L'approche pédologique globale développée dans la partie précédente, nous a permis de mieux comprendre la répartition et le comportement du plomb le long du profil du sol. Nous avons mis en évidence que le plomb provenant de l'activité de l'usine avait migré jusqu'à environ 60 cm de profondeur, et que les concentrations en surface étaient très élevées. Cependant, les concentrations totales en plomb sont insuffisantes pour déterminer le risque que représente cette contamination. C'est pourquoi, grâce aux extractions séquentielles nous avons également déterminé que les 10 premiers centimètres du profil du sol contenaient $4,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ de plomb facilement mobilisable (extrait dans les fractions hydrosoluble et échangeable). En d'autres termes, ce sol au moins en surface, présente un risque potentiel important de transfert du plomb vers la biosphère, notamment vers les plantes. La mesure de ces transferts de métaux des sols vers les plantes est fondamentale pour l'analyse des risques représentés par un sol. Il est capital de déterminer la fraction biodisponible, c'est-à-dire la partie accessible aux organismes vivants dont les végétaux. En effet, les végétaux sont des constituants essentiels des écosystèmes et le premier compartiment de la chaîne alimentaire terrestre. Ainsi, le transfert sol-plante des éléments traces constitue un des dangers les plus préoccupants associés à la pollution des sols, dans la mesure où la plante joue un rôle de vecteur des éléments traces vers les animaux et les hommes.

C'est pourquoi, le second objectif de ces travaux visait à étudier le transfert du plomb depuis ce sol contaminé vers deux plantes potagères, la fève et la tomate. Les plantes réagissent de façon différente selon les espèces. Certaines sont peu ou pas tolérantes, alors que d'autres développent des réactions de défense et freinent l'absorption du plomb en sécrétant des acides qui vont augmenter le pH et par conséquent réduire la mobilité des éléments trace. Le devenir du plomb dans le système sol/plante a donc été étudié. Pour cela, la pénétration du plomb dans les plantes a été évaluée, dans les différents organes. Il est admis que les plantes influencent physiquement et chimiquement leur milieu, dans une zone appelée « rhizosphère ». En effet, avant d'atteindre la surface racinaire, les éléments en trace sont soumis aux conditions spécifiques de l'interface sol-racine, appelée rhizosphère. Les plantes peuvent provoquer des changements considérables des propriétés physico-chimiques du sol, comme une modification de la répartition du plomb au sein de ses phases porteuses, et notamment une augmentation de sa biodisponibilité. Les racines peuvent induire des changements de concentrations ioniques, des modifications de pH ou libérer des complexants organiques dans la rhizosphère.

Dans ce chapitre, les impacts d'une culture sur différents horizons du sol contaminé ont été évalués, tant au niveau des plantes qu'au niveau du sol. Pour ce faire, des expériences ont été conduites sur un dispositif de microculture, qui permet un accès aisé aux racines ainsi qu'au sol rhizosphérique. L'objectif était de voir si la culture sur le sol contaminé avait un effet néfaste sur la croissance et le développement des plantes afin d'évaluer ainsi l'impact du plomb qui dépend beaucoup plus de sa spéciation que de sa concentration totale.

Il s'agissait également d'évaluer dans quelles mesures ces 2 types de végétaux étaient capables de prélever du plomb et de le transloquer vers leurs parties aériennes. Enfin, nous avons cherché à mettre en évidence les changements de pH et de compartimentation (par le biais des extractions chimiques) induits par les racines de ces 2 espèces végétales. Nous voulions enfin évaluer l'influence de ces variations de pH et de spéciation sur la biodisponibilité du plomb en relation avec les caractéristiques du sol et de ce fait sur son transfert vers les plantes. Pour cela, les expériences de transfert ont été réalisées sur les 4 horizons majeurs du profil du sol, déterminés dans la partie III de ce manuscrit. En effet il ne faut pas perdre de vue que le système sol-plante constitue un couple indissociable lorsqu'on étudie le transfert. Selon la nature de la plante et la nature du sol des phénomènes différents et avec des intensités différentes peuvent être observés (projet BAPPET, Pollutec 2007).

Les principaux résultats obtenus lors de ces expériences de transfert sol-plante font l'objet d'une publication soumise au journal « *Environnement International* » en février 2008. Cet article soumis fait donc l'objet du chapitre 2 de cette partie. Pour en faciliter la compréhension, un premier paragraphe présente préalablement le dispositif de culture employé lors de ces expériences, illustré de photographies. Enfin en conclusion de cette partie, quelques résultats complémentaires sont présentés, qui ne figurent pas dans l'article, afin de compléter la discussion sur les mécanismes de transfert. Tout ceci nous permet d'introduire la dernière partie de ce manuscrit, dans laquelle l'impact du plomb sur les plantes a été évalué, et qui fera l'objet d'une troisième publication.

2 Matériels et méthodes

2.1 Espèces végétales

Comme nous l'avons décrit précédemment dans la partie II « Matériels et méthodes », les 2 espèces végétales choisies pour cette étude sont la fève (*Vicia faba*) de type *Aguadulce* et la tomate (*Lycopersicon esculentum* (Mill.) cv Rondello (De ruiters).

2.2 Dispositif de microculture

Une grille en polyamide avec des pores de 2mm de diamètre est fixée au fond d'un premier cylindre en PVC de 25mm de diamètre au moyen d'un élastique. Un second cylindre en PVC de 33 mm de diamètre est fermé au fond par de la toile à bluter en polyamide (avec des pores de 30µm de diamètre, Sefar Nytel/ Fyltis 03-30/18). Le petit cylindre est inséré dans le grand en laissant un espace de 2 à 3mm entre les 2 de façon à permettre le développement du tapis racinaire (Figure 41).

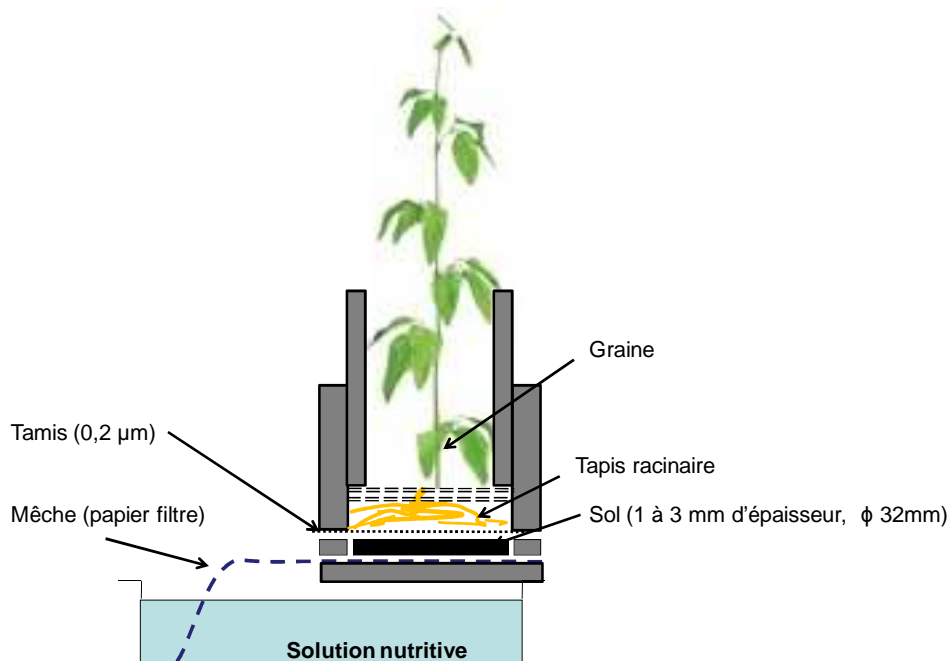


Figure 41: Schéma du dispositif de microculture

Les dispositifs de culture sont placés au dessus de bacs rectangulaires en plastique d'une contenance de 15 litres. Le couvercle des bacs de culture est constitué d'une plaque en polystyrène, percée d'orifices à l'emplacement de chaque dispositif de culture. Deux petits orifices sont également prévus dans la plaque pour permettre le passage des capillaires assurant l'aération de la solution nutritive (Figure 42). L'alimentation en eau des plantes se fait par remontée capillaire dans une mèche de papier trempant dans la solution nutritive.



Figure 42 : Cylindres en PVC ainsi que des bacs permettant la culture des plantes

2.3 Protocole expérimental

2.3.1 Phase de pré-culture

Les graines sont désinfectées avec de l'hypochlorite de calcium 0.9% pendant 15 minutes. Après rinçage à l'eau déminéralisée, une graine est déposée à la base de chaque cylindre intérieur (de petit diamètre), sur la grille de polyamide, de manière à obtenir une plante par dispositif. Les compartiments supérieurs contenant les plantules sont placés à la surface d'une solution nutritive standard aérée en permanence (composition en annexe). Le niveau de solution est maintenu de manière à ce qu'il affleure à la toile à bluter. En effet, il est souhaitable que l'ensemble des racines soit au contact de la solution pendant toute la durée de l'expérience. En effet, chaque racine a son importance et ne se comporte pas forcément de la même façon au sein d'un même système racinaire. Cette phase de pré-culture doit durer le temps nécessaire afin d'obtenir un tapis de racine assez dense sur la toile à bluter (Figure 43). Cette phase a duré 3 semaines pour la tomate et seulement 2 semaines pour la fève, dont les racines sont plus grandes. L'expérience est menée en phytotron avec des conditions de lumière, de température et d'humidité contrôlées (16 heures de jour à 24°C et 8 heures de nuit à 20°C, avec un taux humidité de 75%). Les plantes obtenues à la fin de cette phase de pré-culture sont représentées par la Figure 44.



Figure 43 : Tapis racinaire obtenu après la phase de microculture



Figure 44 : Tomates (à gauche) et fèves (à droite) après respectivement 3 et 2 semaines de préculture en hydroponie, au moment de l'exposition au sol

2.3.2 Phase de culture sur le sol

Après la phase de pré-culture, les plants de fèves et de tomates âgés respectivement de 15 et 21 jours sont transférées sur la fine couche de sol. Pour les expériences qui suivent, cinq sols différents sont utilisés : 4 proviennent du profil de sol de Bazoches, à des profondeurs différentes (0-10, 10-20, 40-50 et 90-100 cm), le 5^{ème} vient d'une parcelle cultivée du lycée agricole d'Auzeville-Tolosane, il est utilisé comme sol témoin, choisi pour avoir des caractéristiques pédologiques proches des deux premiers échantillons de sol (0-10 et 10-20 cm) sans la contamination en plomb. Par contre, du fait de trop grandes différences dans leurs compositions chimiques, ce sol ne peut pas être utilisé comme témoin à proprement parler pour les deux autres échantillons de sol de Bazoches. Par contre, il possède des teneurs en plomb proches de l'échantillon 90-100 cm, ceci nous permettra de comparer le transfert du plomb non plus en fonction de la concentration en plomb, mais plutôt en fonction de la nature du sol. Ce témoin nous sert également à s'assurer de l'absence de pollution dans les échantillons de végétaux.

Comme le montre la Figure 45, 3g de sol mouillé sont déposés sur un papier filtre placé sur une plaque de PVC percée à la dimension du dispositif de culture. Cette plaque est alors déposée sur le couvercle du bac contenant la solution nutritive. Le papier filtre trempe dans la solution nutritive pour permettre d'humidifier le sol en permanence (Figure 41). Puis les cylindres en PVC sont déposés sur la couche de sol (Figure 46)



Figure 45 : Plaques de PVC permettant de déposer la fine couche de sol au-dessous d'un réservoir d'eau permettant l'alimentation hydrique des plantes.



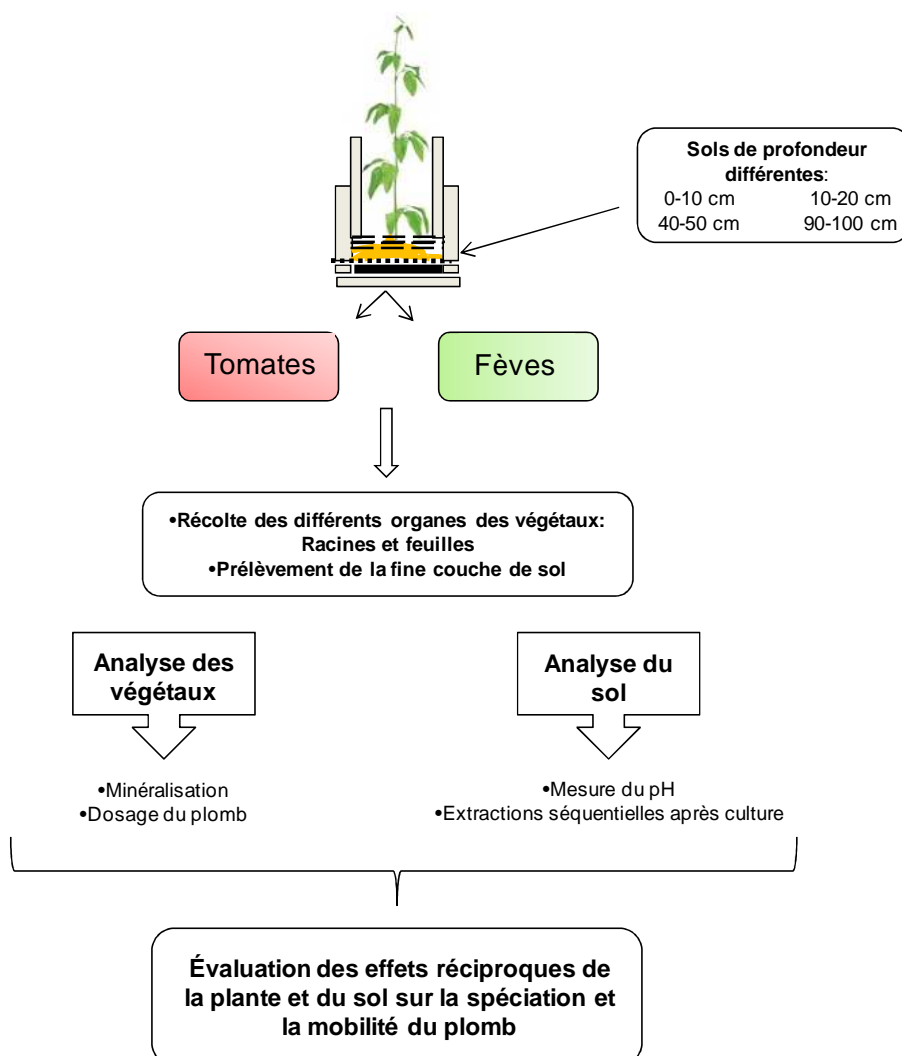
Figure 46 : Contact entre le cylindre en PVC contenant la plante et la fine couche de sol.

Après 8 jours de contact, les plantes sont récoltées, en séparant les racines des feuilles, puis le sol est récupéré et mis à l'étuve pour séchage, afin de pouvoir procéder aux différentes analyses effectuées (Figure 47).



Figure 47 : Tomates (à gauche) et fèves (à droite), après les 8 jours de contact avec le sol, au moment de la récolte.

3 Méthodologie générale



4 Fate of lead in the soil-plant system of *Vicia faba* and *Lycopersicon esculentum* cultivated on a contaminated calcareous soil.

M. Cecchi⁽¹⁾, M. Guiesse⁽¹⁾, J. Silvestre⁽¹⁾, P. Winterton⁽²⁾ and C. Dumat^{(1 *)2}

1-Ecolab, UMR INPT-CNRS-UPS 5245, ENSAT, PO box 107, Auzeville-Tolosane, Av. Agrobiopole, Castanet-Tolosan cedex, 31326, France (<http://www.ecolab.ups-tlse.fr>).

2-Université Paul Sabatier – Toulouse III, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France.

Abstract

A calcareous soil contaminated by atmospheric fallout from a lead recycling plant was investigated to determine the availability and uptake of lead by vegetables. Soil samples from 4 different depths were used in a greenhouse experiment with lead concentrations ranging between 1932 (top soil) and 36 mg.kg⁻¹ (deepest soil sample). Tomatoes and broad beans were cultivated on a microculture device, which, besides allowing shoot analysis, provides easy access to both roots and rhizospheric soil. These experiments aimed at evaluating soil-to-plant transfer of lead, pedological characteristics and rhizospheric dynamics.

After 8 days of contact with contaminated soils, the plant biomasses were not significantly different from those of control plants indicating that they were not adversely affected by lead transfer. However, high lead concentrations were found in the roots, reaching about 1000 mg.kg⁻¹ for the two plants. A large proportion of this Pb was adsorbed onto cell wall constituents (between 45 to 78%). Then, all the translocation factors were between 0.04 and 0.24, indicating limited transport of lead towards the aerial parts, which could contribute to Pb tolerance. In highly contaminated conditions, broad beans seem to absorb more Pb than tomatoes, whereas it is the opposite in weakly contaminated conditions. A one-unit pH decrease and a strong increase of exchangeable Pb occurred in the rhizosphere of the two vegetables. In the current study context, aqua regia lead extraction of soil samples proved to be a good indicator of lead transfer from soil to vegetables.

Key words: lead, soil-plant transfer, rhizosphere, chemical extractions, pH, compartmentalisation

² Corresponding author:

Camille Dumat. Tel.: +33-5-62-19-39-03; Fax: 33-5-62-19-39-01.

E-mail address: camille.dumat@ensat.fr

Résumé

Un sol calcaire contaminé par les retombées atmosphériques d'une usine de recyclage du plomb a été étudié afin de déterminer la disponibilité et le transfert du plomb vers les plantes. Des échantillons de sols prélevés à différentes profondeurs, avec des concentrations comprises entre 1932 mg.kg^{-1} en surface et 36 mg.kg^{-1} en profondeur, ont été utilisés dans une expérience en phytotron. Des tomates et des fèves ont été cultivées sur des dispositifs de microculture, qui en plus de l'analyse des parties aériennes, permet un accès facilité aux racines et au sol rhizosphérique. Ces expériences avaient pour but d'évaluer le transfert sol/plante du plomb, ainsi que les caractéristiques pédologiques et la dynamique de la rhizosphère.

Après 8 jours de contact avec les sols contaminés, les biomasses des plantes n'étaient pas significativement différentes des témoins, indiquant que les plantes n'étaient pas affectées par le plomb. Cependant, des concentrations élevées sont mesurées dans les racines, qui atteignent 1000 mg.kg^{-1} pour les deux plantes. Une grande partie de ce plomb est adsorbé à la surface des constituants de la paroi cellulaire (entre 45 et 78%). Ensuite, tous les facteurs de translocation sont compris entre 0.04 et 0.24, indiquant un transport limité du plomb vers les parties aériennes, ce qui peut contribuer à la tolérance au plomb. Dans des conditions de fortes contaminations, les fèves semblent absorber plus de plomb que les tomates, alors que cette tendance semble s'inverser en cas de contamination plus faible. Une diminution du pH (d'une unité) ainsi qu'une forte augmentation du plomb échangeable sont observées dans la rhizosphère des deux plantes. Dans cette étude, enfin, l'extraction du plomb à l'eau régale dans les échantillons de sol s'est révélé être un bon indicateur du transfert du plomb vers les plantes.

4.1 Introduction and context

Unnecessary for living organisms, lead is a persistent metal frequently related to soil pollution because of its numerous past and present uses: metallurgical industries, mining and smelting, car exhaust, fuel production, soil fertilization and pesticide applications (Alkorta et al., 2004). Potentially toxic to numerous living organisms, even at low concentrations, lead is identified as a priority substance in the recent European Reach law (EC, 2007). Due in particular to its uptake by edible plants and subsequent introduction into the food chain, lead is considered as a human risk above 400-500 mg.kg⁻¹ soil (US EPA, 2001). Therefore, tools for the assessment of the environmental risks induced by lead contamination of soils are needed. More than its total soil concentration, it is the association of a metal with the soil components and its chemical speciation that govern its mobility and availability (Dumat et al., 2001). During the last decades, chemical extraction procedures have been widely used to identify the partition of the metals among various solid phases and to estimate their availability for plants. Numerous extraction procedures exist, often based on that of Tessier et al. (1979) and then modified by many researchers such as Ure et al. (1995); Leleyter and Probst (1999); Dumat et al. (2001).

Both soil (physical and chemical parameters) and plant characteristics (species, variety and maturity) influence metal absorption by plants (Alexander et al., 2006). Therefore there is no universal experimental method for the prediction of metal availability to plants (Wang et al., 2003). Soil-plant transfer is an important link in the chain of events that induces the entry of lead into the human food chain. The measurement of lead absorption by plants in various experimental conditions can therefore give a better understanding of human risk arising from the cultivation of lead-polluted soils. Plants can be used as bio-indicators for risk assessment studies because measuring the metal concentration in plants integrates all the biotic and non-biotic parameters (for instance soil, climatic conditions and agronomic management). Depending on the species, some plants can accumulate large quantities of lead and can be used in remediation processes (Panich-Pat et al., 2004), while others are highly sensitive to lead and could be used as bio-indicators of lead toxicity (Liu et al., 2005). In order to improve the use of plants for the assessment of risks due to polluted soils, supplementary studies are needed to increase the understanding of the mechanisms in the metal-soil-plant system in particular for lead, a transition metal with complex behaviour in the soil. A phenomenon that is not currently taken into account in the patterns of metal absorption is the plant-induced modification of the characteristics of the rhizosphere (soil located around the plant roots, acting as the interface between the roots and the bulk of the soil). Producing various exudates (depending on the species), plants can strongly modify the physical, chemical and biological characteristics of the rhizosphere and consequently the behaviour of the metals (Hinsinger et al., 2003; Lin et al., 2004).

The aim of the present study was to establish the way lead behaves in the soil-plant system, in a calcic cambic soil contaminated by a lead recycling plant. Atmospheric fallout generated by the plant, mainly in the past, increased soil lead concentrations especially in the topsoil. Lead, a highly persistent pollutant, is considered as being little mobile in soils, but a simple chemical approach is not

sufficient to evaluate its mobility and availability because biotic parameters can be involved. Thus, greenhouse experiments were conducted with two common vegetables: tomato and broad bean in order to compare their behaviour and study the mechanisms of lead absorption by plants. In soil samples from various depths, chemical extractions and pH measurements were performed on rhizosphere and bulk soils to assess the effects of both soil parameters and rhizospheric dynamics on the bioavailability of lead.

4.2 Material and Methods

4.2.1 Site description, soil sampling and analysis

The soil studied was sampled in the grounds of a lead recycling plant surrounded by agricultural land and vegetable gardens. It is located in Bazoches-les-Gallérandes in the north of France (*Loiret Département*), 45 km from Orleans. A previous study (Cecchi et al, 2008), using a pedological approach revealed 4 main horizons along the soil profile: an A horizon from 0 to 25 cm depth, a cambic horizon from 25 to 90 cm, a C horizon from 90 to 110 cm, and an R horizon or marl (bed rock), starting at 110 cm. In the present study, two samples in the A horizon (0-10 and 10-20 cm), one in the cambic horizon (40-50 cm) and one in the C horizon (90-100 cm) were used for the plant bioassays. The soil samples were air dried and sieved through a 2 mm stainless steel AFNOR sieve. Aqua regia pseudo-total major and trace element concentrations were determined by digesting air-dried soil samples in a hot acid mixture: 3 HCl: 1 HNO₃ (ISO 11466, 1995) and measured with an IRIS Intrepid II XDL ICP-OES spectrometer (Thermo Electron Corporation, Madison USA). The accuracy of acidic digestion and analyses was verified by the use of the standard soil 141R.

A description of the main physico-chemical characteristics of the four soil samples is presented in table 1. The soil is a calcic cambisol, with a very alkaline pH (from 7.7 in the topsoil to 8.5 at depth), high clay content (between 20 and 33%) and a relatively constant carbonate value down to 90 cm (between 0.73 and 2.5%) which increased in the last sample (48%). Soil organic matter (SOM) and total nitrogen presented high concentrations in the epipedon: 6% and 3.2 g.kg⁻¹ respectively, while the P₂O₅ content was low (88 mg.kg⁻¹). Strong lead contamination of the soil (table 2) was observed, with high lead concentrations in the topsoil (1932 mg.kg⁻¹ soil, in the 0-10 cm horizon) decreasing with depth. Indeed, below 60 cm, concentrations were close to background levels (around 40 mg.kg⁻¹).

Depth (cm)	pH water	CEC* cmol+.kg ⁻¹	Sand	Silt	Clay (%)	Carbonates	SOM
0-10	7.7 ± 0.1	15.1 ± 1.9	21.0 ± 6.2	52.7 ± 6.0	20.3 ± 1.8	2.5 ± 1.2	6 ± 0.1
10-20	7.8 ± 0.2	16.8 ± 0.9	14.6 ± 2.9	56.6 ± 2.8	25.6 ± 2.2	1.5 ± 0.2	3.2 ± 0.1
40-50	8.2 ± 0.05	20.4 ± 0.5	7.5 ± 1.6	58.0 ± 0.8	33.4 ± 1.5	0.7 ± 0.3	1.1 ± 0.1
90-100	8.5 ± 0.05	18.7 ± 0.9	27.2 ± 0.8	42.0 ± 0.7	29.6 ± 0.4	48.2 ± 2.6	1.39 ± 0.4
Control	7.7 ± 0.05	17.6 ± 1.1	36.7 ± 2.0	32.0 ± 1.4	28.0 ± 0.7	2.7 ± 0.9	2.2 ± 0.1

Table 1: Physical and chemical properties of the soil samples

Concerning major elements (table 2), the soil pseudo-total calcium concentrations ranged from 0.65 to 18.2% and followed the carbonate profile ($R^2 = 0.99$). For iron, it was between 1.8 and 2.6%, mainly following the granulometric clay profile, but with the influence of SOM in the topsoil. Table 1 and 2 also present the main characteristics of a control soil, used for the plant biotest: it had a composition rather close to the 2 surface soil samples, but without the metal contamination. It had the same lead concentration as the deep horizon, but with very different soil characteristics.

Depth (cm)	N tot	Ca		Fe		P ₂ O ₅		Pb	
	Kjeldhal	Aqua Regia		Aqua Regia		Joret-Hebert		Aqua Regia	
	g.kg ⁻¹	%		%		mg.kg ⁻¹		mg.kg ⁻¹	
0-10	3.21	1.22	± 0.02	2.31	± 0.06	88	± 19	1932.58	± 7.40
10-20	2.04	1.14	± 0.01	2.45	± 0.19	70	± 18	785.02	± 1.54
40-50	0.82	0.65	± 0.01	2.65	± 0.04	24	± 14	83.40	± 1.46
90-100	0.63	18.21	± 0.36	1.77	± 0.04	34	± 18	35.60	± 0.71
Control	Nd*	33.57	± 0.67	0.52	± 0.01	nd		43.00	± 0.92

*nd: not determined

Table 2: Major and trace element concentrations in the soil samples

4.2.2 Plant biotest

The biotest used was first described by Niebes et al. (1993) and then adapted by Chaignon and Hinsinger (2003). A small PVC cylinder (25 mm inner diameter) was closed by a polyamide net (900 µm mesh) inserted into a larger cylinder, itself closed by a finer polyamide mesh (30 µm, Fyltis/Nytel, Sefar filtration). A space of 3 mm was left between the net and the finer mesh, where the roots could develop as a mat. The two plants: tomato (*Lycopersicon esculentum*, var. Rondello) and broad bean (*Vicia faba*), were first grown hydroponically for 21 days to obtain a large flat mass of roots that fully covered the fine mesh.

Seeds were surface sterilized with 0.9% CaClO for 15 min and rinsed with deionised water. One seed for broad bean and three seeds for tomato were sown in the container on the surface of the coarser mesh. The devices were placed on top of troughs containing an aerated complete nutrient solution with the macroelements: 5 mM KNO₃, 5 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM KH₂PO₄ and 1.5 mM MgSO₄ and oligoelements: 9.11 µM MnSO₄, 1.53 µM ZnSO₄, 0.235 µM CuSO₄, 24.05 µM H₃BO₃, 0.1 µM Na₂MoO₄ and 268.6 µM Fe/EDTA. The height of the nutrient solution was adjusted daily to keep the fine mesh wet during the whole pre-culture period. The experiment was conducted in a growth chamber (temperature 24 ± 0.5 °C/18 ± 0.5 °C day/night cycles; photoperiod 16 h under daylight fluorescent lamps providing 400 µmol.m⁻².s⁻¹ [Philips 600W, Eindhoven, Netherlands] and 8 h darkness; relative humidity 70%).

Then, the second step involved an eight-day soil-plant contact period: the plants were transferred onto the four soil samples corresponding to the various depths (0-10 cm, 10-20 cm, 40-50 cm and 90-100 cm) of the soil profile. This biotest device presents two main advantages: (i) the roots

are physically separated from the soil which enables total recovery of the shoots, roots and soil; (ii) the thickness of the soil layer used enables it to be considered it as rhizosphere soil and provide enough rhizosphere material to evaluate root-induced changes in metal speciation.

4.2.3 Plant analyses

The roots and aerial parts were harvested after the 8 days of soil plant contact. For each treatment 5 replicates were collected and analysed separately. They were weighed fresh and then oven-dried to constant weight at 80°C for 48h. The concentration of lead bound to the outer root cell walls (adsorbed onto roots), called $[Pb]_{adsorbed}$, was determined according to Chaignon and Hinsinger (2003) as follows: roots were shaken end over end with 40mL of 0.001M HCl for 3 min, and then 360 μ L of 1 M HCl was added to yield a final concentration of 0.01 M HCl. After shaking for another 5 min, the suspension was filtered through ashless paper. The plant roots and aerial parts were mineralized separately in a 1:1 mixture of HNO_3 and H_2O_2 at 80°C for 4h. After filtration, the major and trace element concentrations were determined with an IRIS Intrepid II XDL ICP-OES spectrophotometer. The concentration in roots after mineralization is considered as uptaken lead ($[Pb]_{uptaken}$). The accuracy of the acidic digestion and analytical procedures was verified using known reference material (Virginia tobacco leaves, CTA-VTL-2, ICHTJ).

4.2.4 Calculations

Several parameters were calculated from the various lead concentrations measured. First, the total root concentration, or $[Pb]_{root}$, was calculated as follows:

$$[Pb]_{root} = [Pb]_{uptaken} + [Pb]_{adsorbed}$$

Then, the whole plant concentrations ($[Pb]_{plant}$) were calculated using the following formula:

$$[Pb]_{plant} = \frac{[Pb]_{shoot} \times \text{Shoot Dry Weight} + [Pb]_{root} \times \text{Root Dry Weight}}{(\text{Shoot} + \text{Root}) \text{ Dry Weight}}$$

The plants' ability to accumulate metal from soils is often estimated using the bioconcentration or transfer factor (Cui et al, 2004; Chojnacka et al, 2005). This factor is affected by the metal in question, the pH and soil characteristics like the presence of clays or oxides and its cation exchange capacity (CEC), and also by the genotype of the plants. The transfer factor allows a better comparison of Pb availability for various soils. The bioconcentration factor (BCF), was calculated as the plant-to-soil lead concentration ratio: $BCF = [Pb]_{plant} / [Pb]_{Soil}$ (Aqua Regia)

Finally, within the plant, translocation factors (TF) were calculated to show the distribution between aerial and below-ground tissues as follows:

$$TF = [Pb]_{shoot} / [Pb]_{root}$$

4.2.5 Assay of lead associated with soil components using the sequential extractions.

Rhizosphere soil was collected after the 8-day cultures and oven dried at 45°C. The seven-stage sequential extraction procedure (Leleyter and Probst, 1999) was performed on the four soil

PARTIE IV : Etude du transfert sol-plante

samples before and after plant growth in order to determine the effect of the two plants on the compartmentalisation of lead in the rhizosphere. For the 0-10 cm depth sample, only tomato plants were grown. Each chemical fraction was operationally defined as detailed in table 3. The leachate fraction was then analyzed by ICP-OES.

Step	Fraction	Extractant	Reaction time	T (°C)
1	Dissolved with water	Water (10mL)	30 min	20
2	Exchangeable	1M Magnesium nitrate, pH 5 (10 mL)	2 hours	20
3	Bound to carbonates or acid-soluble fraction	1M Sodium acetate, pH 4.5 (10mL)	5 hours	20
4	Bound to Mn oxides	0.1M Hydroxylammonium chloride pH 3.5 (10mL)	30 min	20
5	Bound to amorphous iron oxides	0.2M Ammonium oxalate + 0.2M Oxalic acid (10 mL)	4 hours	20
6	Bound to crystalline iron oxides	0.2M Ammonium oxalate + 0.2M Oxalic acid + Ascorbic acid (10 mL)	30 min	80
7	Bound to organic matter or oxidizable fraction	35% Hydrogen peroxide (8mL)+ 0.02M Nitric acid (3mL), pH 2 3.2M Ammonium acetate (5mL)	5 hours	85

Table 3: Summary of the 7-step sequential extraction procedure (Leleyter and Probst, 1998)

4.2.6 Statistical analysis

Data were analysed by one-way analysis of variance to determine the significance of the results, using STATISTICA v 7.0. Mean values were compared using the least significant difference (LSD) at the 5% level.

4.3 Results

4.3.1 Plant biomass and lead uptake

Biomass data are presented in figure 1.

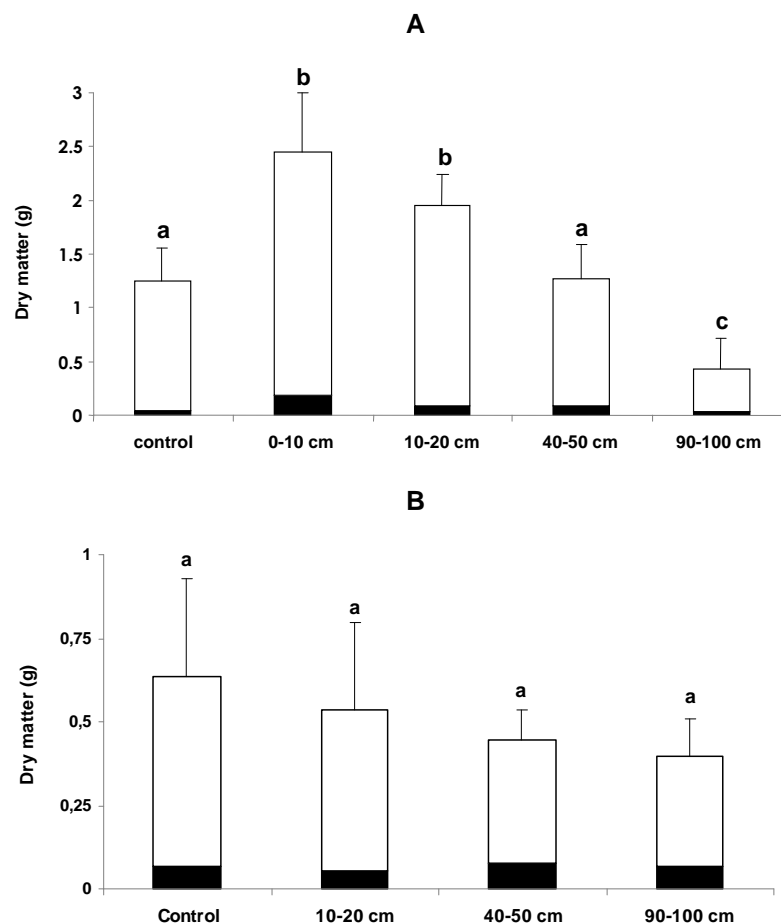


Figure 1: Plant dry matter (g) of roots (black) and aerial parts (white) after 8 days of culture, with A: Tomato and B: Broad bean

After 8 days of soil-plant contact, mean broad bean biomass was not statistically different from that of the controls. On the other hand, tomato biomass results showed significant differences: plants cultivated on the 0-10 cm soil sample had the highest biomass (2.45g), whereas plants cultivated on the 90-100 cm soil sample showed the lightest plants (0.42g). In addition to different lead concentrations, these 2 soil samples possessed very different pedological characteristics: (i) the 0-10 cm soil had a high level of organic matter (6%), a limited CaCO_3 content (2.5%) and a pH of 7.7; (ii) the 90-100 cm horizon had a much lower SOM content (1.3%), a high level of CaCO_3 (48%) and a correspondingly higher pH (8.5). For both tomato and broad bean, root biomass was much smaller than the biomass of the aerial part.

Lead concentrations (mg.kg^{-1}) in the roots (with the adsorbed and the uptaken lead) and aerial parts are presented in tables 4, with table 4A for tomatoes and 4B for broad bean.

PARTIE IV : Etude du transfert sol-plante

A									
Tomato	[Pb] mg.kg ⁻¹								
	Roots						Shoots		
	Adsorbed			Uptaken			Total		
Uncontaminated	13.39 ^a	±	14.46	11.26 ^a	±	5.73	24.65	0.79 ^a	± 0.48
0-10 cm	673.70 ^c	±	214.33	507.66 ^d	±	22.22	1181.36	62.17 ^d	± 2.55
10-20 cm	684.50 ^c	±	216.26	370.90 ^c	±	65.75	1055.40	49.85 ^c	± 13.53
40-50 cm	179.24 ^b	±	63.04	40.77 ^b	±	17.11	220.01	10.52 ^b	± 3.82
90-100 cm	46.57 ^{ab}	±	20.40	38.45 ^{ab}	±	6.75	85.02	4.80 ^{ab}	± 0.43

B									
Broad Bean	[Pb] mg.kg ⁻¹								
	Roots						Shoots		
	Adsorbed			Uptaken			Total		
Uncontaminated	7.19 ^a	±	6.07	4.41 ^a	±	1.14	11.60	1.14 ^a	± 1.20
0-10 cm	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	nd	± nd
10-20 cm	633.14 ^b	±	439.55	226.55 ^b	±	79.12	859.69	54.44 ^c	± 25.80
40-50 cm	50.79 ^a	±	14.30	32.72 ^a	±	4.84	83.51	21.37 ^b	± 14.94
90-100 cm	26.53 ^a	±	10.32	23.37 ^a	±	0.46	49.90	14.29 ^{ab}	± 7.82

Table 4: Lead concentrations (mg.kg⁻¹) in plant parts after 8 days of soil-plant contact on the microculture device, with A: Tomato and B: Broad bean.

A wide range of lead concentrations was observed among the shoots and roots of plants grown on the contaminated horizons. Measurements on the reference samples (Tobacco leaf VTL-2) demonstrated the validity of the assays: the concentration we found was 21.6 ± 1 mg.kg⁻¹, for a certified value of 22.1 ± 1.2 mg.kg⁻¹. In the control plants, lead was close to the detection limit in the aerial parts (1 mg.kg⁻¹ for broad bean and 0.8 mg.kg⁻¹ for tomato) and only low concentrations were found in the roots (12 and 25 mg.kg⁻¹ of lead for broad bean and tomato respectively). It can be noted that the Pb content in all plant tissues increased with increasing soil metal concentration. Comparing the total concentration in roots and aerial parts shows that lead was mainly accumulated in the roots, and that only a small amount was translocated to the aerial parts.

In the aerial parts of broad bean, lead concentrations (table 4B) were between 14 mg.kg⁻¹ (for plants grown on the 90-100 cm horizon soil) and 54 mg.kg⁻¹ (with the 10-20 cm horizon). In the roots they were between 23 and 227 mg.kg⁻¹ for the uptaken lead and between 27 and 633 mg.kg⁻¹ for the adsorbed lead. In summary, broad bean total root concentrations were between 50 and 860 mg.kg⁻¹. This means that 80 to 95% of the lead was located in the roots of the broad bean.

For tomatoes (table 4A), concentrations ranged between 5 mg.kg⁻¹ and 62 mg.kg⁻¹ in aerial parts, 38 and 508 mg.kg⁻¹ uptaken by the roots and 47 and 685 mg.kg⁻¹ for the adsorbed lead. Thus, tomato

root total concentrations ranged between 85 and 1181 mg.kg⁻¹ with 85 to 95% of the total lead being located in the roots. Lead concentrations in roots were sometimes higher than lead concentrations in soils, but considering the weak biomasses of the plants, the quantities of lead extracted by roots were very low.

4.3.1 Lead in the rhizosphere soils: comparison of the pH and sequential extraction results obtained in bulk and rhizospheric soil

Table 5 shows the pH modifications in the four soil samples after being in contact with the root mat. Significant decreases in rhizosphere pH were observed both for tomato and broad bean on all the soil samples tested compared with the soil before plant growth. Roots of tomato and broad bean induced soil acidification by about 1 pH unit.

Depth (cm)	Before Culture		After Culture	
			Tomato	Broad Bean
0-10	7.7	± 0.08	6.71 ± 0.38	nd*
10-20	7.83	± 0.22	6.7 ± 0.12	7.01 ± 0.2
45-50	8.23	± 0.05	7.14 ± 0.08	7.14 ± 0.08
90-100	8.53	± 0.05	7.23 ± 0.07	7.3 ± 0.14
Uncontaminated	7.7	± 0.06	7.17 ± 0.48	6.59 ± 0.18

nd: not determined

Table 5: pH of soils before and after the microculture experiment

Sequential chemical extractions performed both on bulk and rhizospheric soil showed a modification in the distribution of lead in the soil compartments after soil-plant contact (figure 2). The carbonate-bound fraction, mainly present in the bulk soil (between 40 and 60% of the total lead) underwent a strong decrease: between 26 and 70%. The bioavailable fraction (sum of the water-soluble and exchangeable fractions) was also strongly modified by plant growth. These 2 fractions (water-soluble and exchangeable) are little represented in the bulk soil (between 0.01 and 0.3 %), but after plant growth, the concentrations were multiplied by approximately 5 in surface soil samples and almost 1000 in deep samples. The reducible fraction (contained in extractions 4, 5 and 6 of the sequential procedure) that represents 9 to 57% of the total lead in the bulk soils, was less susceptible to plant action except in the 10-20 cm sample where it decreased by 65%. Finally, the oxidisable fraction (step 7) that represents 3 to 38% of the total lead in the bulk soils was little modified in the 2 surface soil samples, on the other hand, it increased in deep samples, in particular in the 40-50 cm sample where it rose by about 300 %.

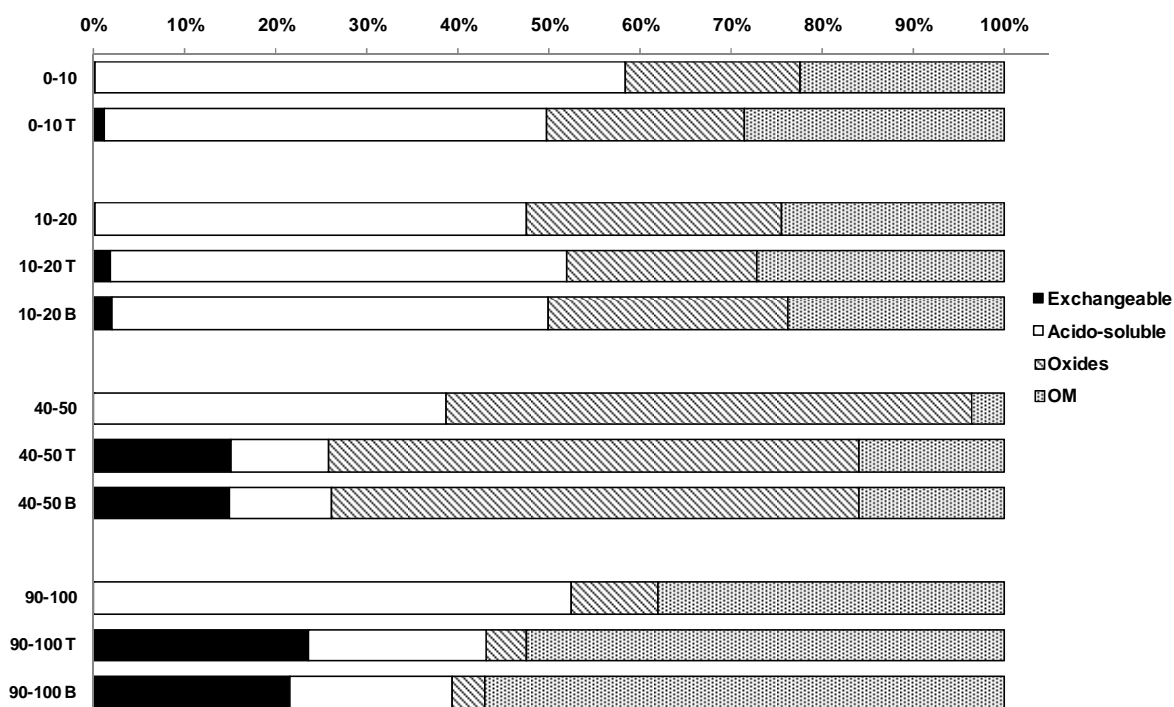


Figure 2: Comparison of lead distribution in bulk and rhizospheric soil after 8 days of culture (with T for tomato rhizosphere and B for Broad bean rhizosphere).

4.4 Discussion

4.4.1 Growth of plants in relation with culture conditions

In this study, broad bean and tomato growth did not seem to be affected by the lead content. Indeed, plants cultivated on the 0-10 cm and 10-20 cm soil samples showed significantly higher biomasses than control plants. In spite of their high Pb content, these samples presented the best growth conditions for plants (pH, highest SOM and N content), which could explain the biomass increase. In addition to these high SOM, nitrogen and available phosphorus levels, pH was the main factor affecting tomato plant ($r^2 = 0.98$) and broad bean ($r^2 = 0.92$) biomass production. From the topsoil to 90-100 cm depth, pH increased from 7.7 to 8.5 (Table 1) while the biomass production decreased for both plants (figure 1), even though the differences were not significant for broad bean. Moreover, this increase of biomass production could also be a response to lead exposure according to Wierzbicka et al. (1998). They observed an increase in polysaccharide synthesis, leading to a higher plant biomass after lead exposure.

In spite of the short duration of soil/plant contact, high lead concentrations were found in the plants. The microculture device used to keep the roots in contact with the soil needs a phase of hydroponic pre-culture, to obtain a dense root mat. This hydroponic phase prior to the soil exposure involves the formation of a greater mass of roots than could be obtained after 3 weeks of culture in soil exclusively. Indeed, the nutritive solution allows optimal nutrition of the plant and thus maximum development. This may have participated in concentrating lead especially in roots, where the levels assayed were very high, by increasing the number of lead binding sites on the roots.

4.4.2 Lead uptake by plants

4.4.2.1 Lead adsorbed onto roots.

Lead concentrations in plants increased with increasing lead concentration in the soil and with all soils, the highest concentrations were always found in the roots. Moreover, the lead in the roots was predominantly adsorbed onto the cell walls. Indeed, 50 to 78% of the lead in tomato roots and 46 to 77% of the lead in broad beans roots was extracted during the desorption procedure (table 4). The importance of the apoplastic route in the soil-plant transfer of lead was previously described by several authors at non-lethal concentrations (Tung et Temple, 1996; Seregin et al., 2001 and 2004). According to Seregin et al. (2004), Pb enters plants from soil via the root system, and then at the root surface Pb^{2+} binds to the carboxyl groups of the mucilage surrounding the roots. Subsequently, part is sequestered in the apoplast of rhizodermal and cortical cells, restricting metal uptake into the roots. In spite of this efficient mucilage barrier, part of the lead can be absorbed by the roots cells.

4.4.2.2 Bioconcentration factor.

In this study, the increases of lead in the plants paralleled the increasing concentrations in the soil. The transfer factors calculated for each soil horizon (table 6A) ranged from 0.05 to 0.53. These BCF are high, certainly due to the high lead concentrations found in the plants. However, relatively few results concern the absorption of lead by vegetables particularly on French soils. Moreover, the BCF calculation differs greatly according to the author. Indeed, some take the BCF to be the ratio between roots and total soil concentrations, while others use the whole plant or the concentration in just the edible part (Cui et al., 2004; Zheng et al., 2007). All these parameters make comparing our results difficult.

Moreover, our experimental results indicate that the transfer factors for tomatoes and broad beans decrease with increasing levels of lead in the soil. This is in agreement with results reported by Zheng et al (2007), Wang et al (2006) or Dudka et al (1996) in vegetables growing in contaminated sites. It is suggested that the high metal concentrations in the soil restrain the transfer of metals from soils to vegetables. This could be linked to the saturation of the adsorption sites in the roots or could indicate the development by plants of some degree of tolerance to metal toxicity. Plants are able to restrict the uptake of metals by phytochelatin sequestration or metal accumulation in certain cell compartments (Patra et al., 2004).

A		
Transfer factors		
	Tomato	Broad Bean
0-10 cm	0.08 ± 0.01	nd
10-20 cm	0.13 ± 0.03	0.19 ± 0.10
40-50 cm	0.28 ± 0.11	0.40 ± 0.13
90-100 cm	0.53 ± 0.53	0.47 ± 0.19
control	0.12 ± 0.20	0.05 ± 0.04
nd: not determined		

B		
Translocation factor		
	Tomato	Broad Bean
Uncontaminated	0.24 ± 0.48	0.10
0-10 cm	0.04 ± 0.01	nd ± 0.11
10-20 cm	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.09
40-50 cm	0.09 ± 0.04	0.24 ± 0.18
90-100 cm	0.09 ± 0.08	0.11 ± 0.06
nd: not determined		

Table 6: Bioconcentration factor (A) calculated as the ratio between $[Pb]_{plant}$ and $[Pb]_{soil}$ and Translocation factor (B) calculated as the ratio between $[Pb]_{shoots}$ and $[Pb]_{root}$

4.4.2.3 Translocation factor.

Our experimental results showed that most of the lead is immobilized in the roots and cannot reach the shoots. It is a well-known fact that roots provide the primary path for the penetration of metal ions, and according to several authors like Pendergrass et al. (2006) lead accumulates mainly in the roots while only a small part is transported through the plant to the leaves. Root tissue concentrations have been reported to be 50-fold those of the leaves (Piechalak et al., 2002). In our study, where we measured Pb uptake, 70% occurred in the roots. Studying species of the Brassica family and other plants, Kumar et al. (1995) also demonstrated that generally about 75 to 80% of the Pb accumulated by a plant is found in the roots. To illustrate this phenomenon, the translocation factors or shoot/root ratios calculated (table 6B) indicate the ability of plants to transport metals from the roots toward the aerial parts (Ferrand et al., 2006). In all treatments, both broad bean and tomato showed a low translocation factor (<1), emphasizing the immobilization of the metal in the roots, with very limited transport to shoots and leaves, i.e. an exclusion strategy (Baker, 1981). As reported by Baker, if this factor is >1 , the plants are concentrators of the element and if the factor $=1$, the plants behave indifferently to it.

We can also note that the lowest translocation factor was observed for plants grown on the most contaminated soil. This has already been shown by Chaignon and Hinsinger (2003) for copper in tomato and by Wang et al. (2006) for several other metals. With lead, it can be linked to a mechanism regulating transport to the aerial parts, lowering toxicity. Indeed, as explained above, the translocation factor is low due to lead immobilization in the roots. This is believed to result from the progression of the lead being prevented by the Casparian strips in the endodermal cells (Seregin et al., 2004). They limit the penetration of lead into the root cells and thus the toxic effects of lead on the metabolically active cell compartments (Patra et al., 2004). This mechanism enables the growth and propagation of plant species in contaminated sites.

Tomato and broad bean seem to show slight differences in behaviour. For uncontaminated horizons, considering the BCF, Pb accumulation was greater in tomato in comparison with broad bean, whereas it was the contrary in contaminated horizons (table 6A). In any case, tomato appeared more able than broad bean to restrict the translocation of lead from roots to shoots (Table 6B).

4.4.3 Influence of the plants on the behavior of metals in their rhizosphere

The results show that broad bean and tomato root activities caused a significant decrease in soil pH, enhancing lead solubility (table 5). This phenomenon has already been observed for calcareous soil by Chaignon and Hinsinger (2003). Various origins can be proposed for the H^+ released into the rhizosphere by the roots. CO_2 from respiration may significantly contribute to rhizosphere acidification in calcareous soils (Nye, 1986; Chaignon and Hinsinger, 2003). Moreover, plants produce exudates, containing in particular low molecular weight organic acids (LMWOA) like citric, succinic, malic, and cis-aconitic acid that can modify metal toxicity. These exudates are released in the rhizosphere by the roots and can modify the pH by as much as one unit (Jones, 1998; Renella et al., 2004; Lin et al., 2004). Finally, according to Hinsinger et al. (2003), the nitrogen source (NO_3^- or NH_4^+) plays an important role in the anion-cation imbalance and thus in the way the pH changes.

In this work, increases in lead concentration and decreases in pH parallel a modification of lead distribution among the different soil fractions as highlighted by the chemical extraction results (figure 2). These significant differences in the forms of lead occurring in the rhizosphere and those in the bulk soil indicate that the root activity leads to changes in lead distribution. These changes might also be dependent on the contributions made by the various soil components and on the actual soil lead content. According to several authors (Jones, 1998; Lin et al., 2004; Kidd and Monterroso, 2005) the exchangeable lead (sum of water-soluble and exchangeable fraction) was much higher in the rhizosphere than in the bulk soil. Thus, the availability of lead was enhanced in the rhizosphere, due to the root activity. The first fraction affected by plant growth among all the soil samples is the carbonate-bound fraction. It was reduced in the rhizosphere compared to bulk soil. The increased acidity could have displaced the equilibrium towards bicarbonates, which are less stable than carbonates (Sauvé et al., 1998).

This suggests that a transformation of carbonate-bound (as well as a part of the oxide-bound lead) into exchangeable lead may have happened, explaining the considerable increase in the water-

soluble and exchangeable fractions in spite of plant uptake. When the carbonate-bound fraction of lead was affected by plant growth, the lead bound to the organic fraction was enhanced in all soil samples.

4.4.4 Transfer of lead in the soil-plant system

In order to explain the transfer of lead from soil towards plants, relationships were sought between: (i) lead mobilised by chemical extractions in bulk soil and rhizospheric soil, (ii) soil characteristics and (iii) lead concentrations in plants (figure 3).

Firstly, shoot lead concentrations were correlated with soil available lead (the sum of the first 2 steps of the sequential extractions) (figure 3A). The two parameters appeared to be linked by a linear function, but, the equations given in figure 3 for the two plants show that the lead concentrations are 16-fold higher in broad bean shoots and 13-fold in tomato shoots than the concentrations of available lead in the bulk soil. The available lead fraction measured in the bulk soil is therefore an imperfect indicator of lead uptake by shoots. However, taking into account the available fraction determined in the rhizospheric soil plus the part of the carbonate-bound fraction easily displaced by plant activity (20% for broad bean and 5% for tomato), a better correlation was obtained with shoot lead concentration – slope of equations 1 and 2 of about one:

$$Y_b = 0.8346 x_b + 9.5295, R^2 = 0.999 \text{ (broad bean)} \quad (1)$$

$$y_t = 1.1483 x_t + 5.3294 R^2 = 0.787 \text{ (tomato)} \quad (2)$$

where y_b and y_t represent the lead concentration of broad bean and tomato shoots, and X_b and X_t soil lead extracted in steps 1 and 2 and partly step 3 (Table 3). This result still confirms the greater ability of broad bean to absorb lead compared to tomato placed under the same soil contamination conditions.

Secondly, total root concentrations showed a good correlation with aqua regia soluble lead in soil (figure 3B). Below a level of 1000 mg Pb kg⁻¹ soil, the lead concentration in roots was very similar to that in the soil. On the other hand, above 1000 mg Pb kg⁻¹ soil, a phenomenon of saturation seems to occur, and the concentration in the roots never reaches that in the soil. Finally, in an effort to explain the lead content in the whole plant, extraction with aqua regia is still the soil parameter giving the best correlation (figure. 3C). Even though a single universal chemical test to estimate the availability of metals for plants appears difficult to establish, a test for a given context could be more feasible. In the context of our study (industrially contaminated calcareous soil), the lead fraction extracted from the soil with aqua regia appears to be a relevant parameter to evaluate the availability of this metal for plants.

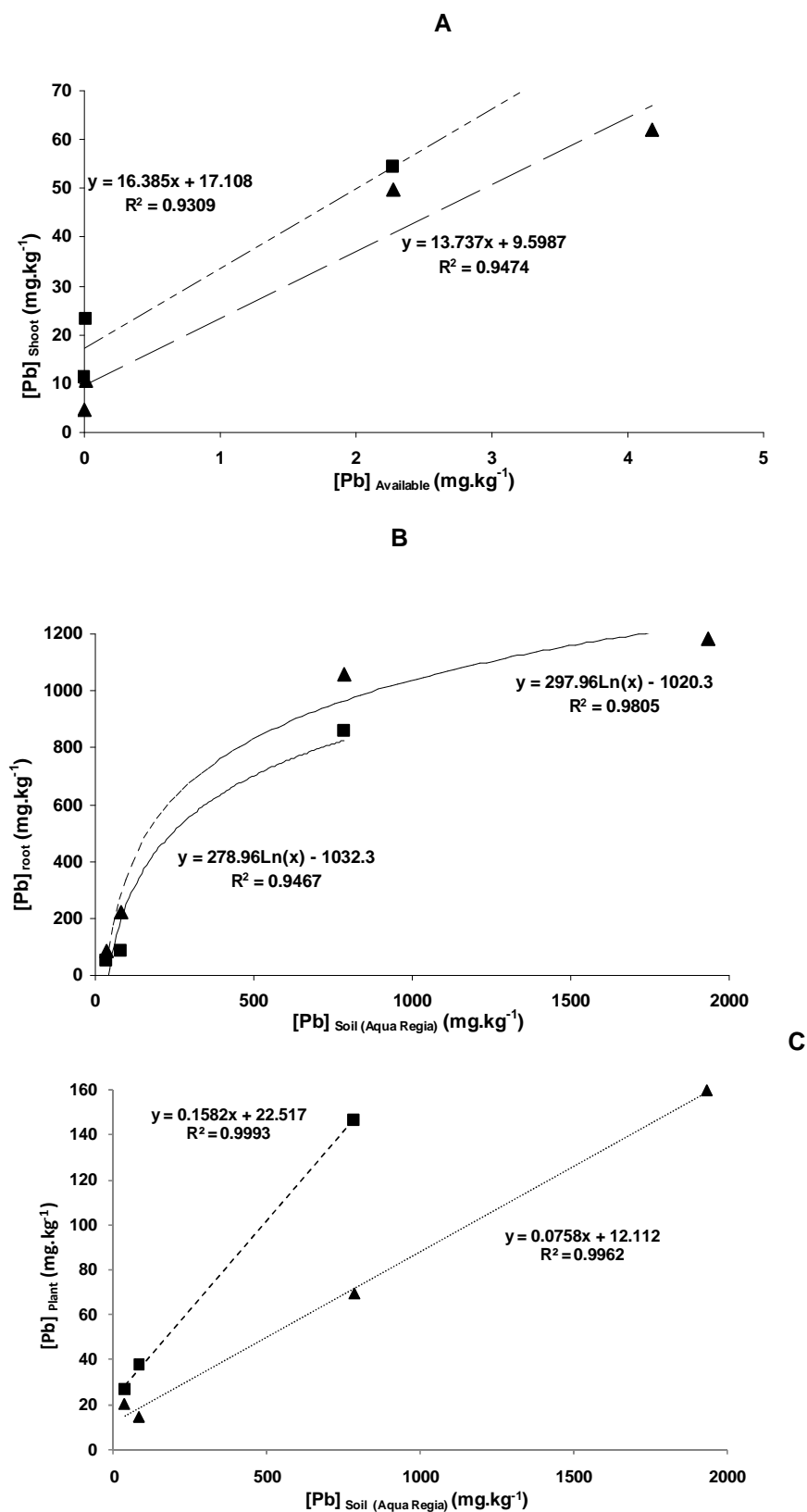


Figure 3: Lead concentrations in different plant organs and in different soil fractions (▲ tomato; ■ broad bean)

4.5 Conclusions and Perspectives

The experimental approach used in the present work provided easy access to the different plant organs and to rhizosphere soil. This enabled us to investigate soil-to-plant transfer as well as root-induced processes likely to occur in the rhizosphere: pH changes and bioavailability modifications.

Over the wide range of Pb soil concentrations (from 36 to 1932 mg.kg⁻¹) and soil characteristics studied, actual plant biomass production was not visibly affected by lead. Much greater concentrations of Pb were found in roots than in shoots, and most of the Pb was bound to the cell wall constituents. This, besides weak translocation towards the shoots (TF always <1) could account for the Pb tolerance observed. Lead transfer and translocation differed slightly between the 2 plants. Soil-to-plant transfer was higher in broad bean than in tomato in the contaminated horizons and root-to-shoot translocation was always weaker for tomato than broad bean.

Both tomato and broad bean roots led to systematic acidification of the soil, and the chemical extraction results showed that exchangeable Pb in the rhizosphere of the 2 plants was much higher than in the bulk soil. Lead compartmentalisation was modified under plant activity with a particularly significant quantity of carbonate-bound lead being dissolved from the broad bean rhizosphere.

At lead soil levels of under 1000 mg Pb kg⁻¹, in the context of our study, soil aqua regia extraction appears to be a relevant technique to evaluate the bioavailability of lead towards tomato and broad bean. Growing plants on the various soil horizons showed that, as long as the soil is not part of a rhizosphere, the proportion of exchangeable lead is low. As soon as the soil is in contact with roots, the exchangeable fraction increases considerably. Simply using chemical extractants to quantify exchangeable lead is therefore not sufficient and the use of plants to assess the risks of transfer to plants seems essential. The deep horizons of this soil present only few risks as long as the crops do not make very deep roots. Caution should be taken however with trees and other deep-rooted plants which can thus reach these horizons.

4.6 Acknowledgements

The authors acknowledge MENRT and STCM (P. Pradère) for financial support and access to the site. Thanks to the Lara Europe Sol laboratory for the soil analysis. We thank Dr P. Hinsinger from INRA for scientific discussions on culture device experiments.

4.7 References

- Alexander PD, Alloway BJ, Dourado AM.** Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environ Pollut* 2006; 144: 736-745.
- Alkorta I, Hernández-Allica J, Becerril JM, Amezaga I, Albizu I, Garbisu C.** Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Rev Environ Sci Biotech* 2004; 3: 71-90.
- Baker A.** Accumulators and excluders. Strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutr* 1981; 3: 643-654.

- Cecchi M, Dumat C, Alric A, Felix-Faure B, Pradère P, Guiresse M.** Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma*, 2008; in press.
- Chaignon V, Hinsinger P.** A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated Soil. *J Environ Qual* 2003; 32: 824-833.
- Chojnacka K, Chojnacki A, Gorecka H, Gorecki H.** Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Sci Total Environ* 2005; 337: 175-182.
- Cui Y-J, Zhu Y-G, Zhai R-H, Chen D-Y, Huang Y-Z, Qiu Y, Liang J-Z.** Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Nanning, China. *Environ Int* 2004; 30: 785-791.
- Dakora FD, Phillips DA.** Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 2002; 245: 35-47.
- Dudka S, Piotrowska M, Terelak H.** Transfer of cadmium, lead, and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: A field study. *Environ Pollut* 1996; 94: 181-188.
- Dumat C, Chiquet A, Goody D, Aubry E, Morin G, Juillot F, Benedetti M.** Metal ion geochemistry in smelter impacted soils and soil solutions. *Bull Soc Géol France* 2001; 172: 539-548.
- Ferrand E, Dumat C, Leclerc-Cessac E, Benedetti M.** Phytoavailability of zirconium in relation to its initial added form and soil characteristics. *Plant Soil* 2006; 287: 313-325.
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B.** Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* 2003; 248: 43-59.
- ISO11466.** Soil quality. Extraction of trace elements soluble in aqua regia. International Organization of Standardisation, Geneva, Switzerland. 1995.
- Jones DL.** Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 1998; 205: 25-44.
- Kidd PS, Monterroso C.** Metal extraction by *Alyssum serpyllifolium ssp. lusitanicum* on mine-spoil soils from Spain. *Sci Total Environ* 2005; 336: 1-11.
- Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I.** Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ Sci Technol* 1995; 29: 1232-1238.
- Leleyter L, Probst J-L.** A new sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace elements in river sediments. *Int J Environ Anal Chem* 1999; 73: 109 - 128.
- Lin Q, Chen YX, He YF, Tian GM.** Root-induced changes of lead availability in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. *Agr Ecosyst Environ* 2004; 104: 605-613.
- Liu H, Probst A, Liao B.** Metal contamination of soils and crops affected by the Chenzhou lead/zinc mine spill (Hunan, China). *Sci Total Environ* 2005; 339: 153-166.
- Niebes J-F, Dufey JE, Jaillard B, Hinsinger P.** Release of nonexchangeable potassium from different size fractions of two highly K-fertilized soils in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* cv Drakkar). *Plant Soil* 1993; 155-156: 403-406.
- Nye P.** Acid–base changes in the rhizosphere. *Advances in Plant Nutrition* 1986; 2: 129-153.
- Panich-Pat T, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Upatham E, Srinives P, Lanza G.** Removal of lead from contaminated soils by *Typha Angustifolia*. *Water Air Soil Pollut* 2004; 155: 159-171.
- Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A.** Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot* 2004; 52: 199-223.
- Pendergrass A, Butcher DJ.** Uptake of lead and arsenic in food plants grown in contaminated soil from Barber Orchard, NC. *Microchem J* 2006; 83: 14-16.

- Piechalak A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D, Malecka A.** Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 2002; 60: 153-162.
- Renella G, Landi L, Nannipieri P.** Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma* 2004; 122: 311-315.
- Sauvé S, Mc Bride M, Hendershot W.** Soil solution of lead (II): Effect of organic matter and pH. *Soil Sci Soc Am J* 1998; 62: 618-621.
- Seregin IV, Ivanov VB.** Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ J Plant Physiol* 2001; 48: 523-544.
- Seregin IV, Shpigun LK, Ivanov VB.** Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize Roots. *Russ J Plant Physiol* 2004; 51: 525-533.
- Tessier A, Campbell PGC, Bisson M.** Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal Chem* 1979; 51: 844-851.
- Tung G, Temple PJ.** Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *Sci Total Environ* 1996; 188: 71-85.
- Ure A, Davidson C, Thomas R.** Single and sequential extraction schemes for trace metal speciation in soils and sediments. *In: Quevauviller P, Maier E, Griepink B, editors. Quality assurance for environmental analysis. Elsevier, 1995, pp. 505-523.*
- US EPA.** Identification of dangerous levels of lead: final rule. *Code of federal register* 2001; 66: 1206-1240.
- Wang G, Su M-Y, Chen Y-H, Lin F-F, Luo D, Gao S-F.** Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in southeastern China. *Environ Pollut* 2006; 144: 127-135.
- Wierzbicka M.** Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips--ultrastructural studies. *Plant Sci* 1998; 133: 105-119.
- Zheng N, Wang Q, Zheng D.** Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn, and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc Plant in China via consumption of vegetables. *Sci Total Environ* 2007; 383: 81-89.

5 Conclusions et perspectives

Les travaux présentés dans l'article étaient basés sur l'utilisation d'un dispositif de culture qui présentait plusieurs avantages. Les conditions de préculture ont favorisé l'obtention d'un tapis racinaire dense physiquement séparé de la fine couche de sol. Ce dispositif a permis les transferts entre le sol rhizosphérique et les racines. Il a également permis la récupération aisée des racines propres, sans perte de matériel ni particules de sol, mais aussi celle du sol rhizosphérique après les 8 jours de culture. Ce dispositif a donc permis de mettre en évidence certains processus se déroulant à l'interface sol-racines.

Tant que les sols ne sont pas cultivés, la fraction échangeable est assez faible (excepté dans l'horizon de surface). Cependant, les racines entraînent une diminution du pH d'une unité dans toutes les conditions d'expérience. Cette acidification du sol a pour conséquence une dissolution des carbonates présents dans le sol. Le plomb des carbonates est alors libéré et passe dans les fractions échangeable et soluble dans l'eau. En conséquence, les quantités disponibles pour les plantes augmentent de façon significative.

Les résultats au niveau des plantes, montrent tout d'abord une absence de toxicité du sol contaminé. En effet, la production de biomasse n'est pas affectée après 8 jours d'exposition aux sols contaminés. Les concentrations retrouvées dans les plantes sont quand à elles élevées dans les parties aériennes, et très élevées dans les racines. Ceci est en accord avec la plupart des études menées sur le transfert sol-plante. En effet, la littérature reporte que le plomb est majoritairement séquestré dans les racines dans la plupart des plantes, à l'exception des plantes hyper-accumulatrices, qui elles au contraire montrent une importante translocation vers les parties aériennes. Un autre fait notable est la très forte proportion de plomb désorbé par l'HCl dilué. La très grande majorité du plomb retrouvé dans les racines est en fait adsorbé à la surface, ce qui est confirmé par les travaux de Tung et Temple (1996) pour le plomb, de Chaignon et Hinsinger (2001) pour le Cu ou de Ferrand et al. (2006) pour le zirconium. Ces auteurs suggèrent que les ions métalliques se fixent à la surface des racines sur les groupements carboxyliques de la paroi cellulaire.

D'une façon générale, contrairement à ce qui est souvent rapporté dans la littérature, le sol que nous avons étudié présentait une phytodisponibilité relativement élevée. Cependant, la comparaison du transfert sol/plante (BCF) entre les différentes études est rendue difficile par l'ambiguïté résidant dans le calcul du facteur de transfert. En effet, selon les auteurs, il peut être calculé comme le ratio entre la teneur en plomb dans les plantes entières (masses sèches) et la concentration en plomb dans le sol, mais également comme le ratio entre la teneur en plomb dans les racines et la concentration en plomb dans le sol. D'autres auteurs le calculent également comme un ratio des teneurs dans les parties comestibles des plantes (calculées par rapport à la masse fraîche). Ces différences entraînent des BCF qui peuvent être extrêmement variables selon les teneurs dans les plantes considérées, comme le montre le Tableau 14. En effet, prendre en compte uniquement la teneur dans les racines augmente considérablement ce BCF par rapport au BCF calculé avec les teneurs dans les plantes entières. Dans le tableau, pour chaque plante, la colonne de gauche

présente le BCF calculé dans l'article, alors que la colonne de droite correspond au BCF que l'on obtiendrait en considérant la concentration dans les racines pour le calculer.

	BCF Tomates		BCF Fèves	
	$[\text{Pb}]_{\text{plant}} / [\text{Pb}]_{\text{soil}}$	$[\text{Pb}]_{\text{root}} / [\text{Pb}]_{\text{soil}}$	$[\text{Pb}]_{\text{plant}} / [\text{Pb}]_{\text{soil}}$	$[\text{Pb}]_{\text{root}} / [\text{Pb}]_{\text{soil}}$
0-10 cm	0.08	0.61	nd	nd
10-20 cm	0.13	1.34	0.19	1.10
40-50 cm	0.28	2.65	0.40	1.01
90-100 cm	0.53	2.39	0.47	1.40
control	0.12	0.57	0.05	0.27

Tableau 14 : Comparaison des BCF calculés en considérant la teneur en plomb dans les plantes entières ou dans les feuilles.

Il est donc important de toujours bien préciser de quelle manière sont calculés les BCF, et d'essayer de l'adapter au contexte de l'étude.

Les concentrations élevées dans les plantes combinées à l'absence de toxicité nous ont conduits à étudier les relations pouvant exister entre le plomb et les macro éléments. Les relations entre le plomb et le calcium sont présentées sur la Figure 48 et la Figure 49.

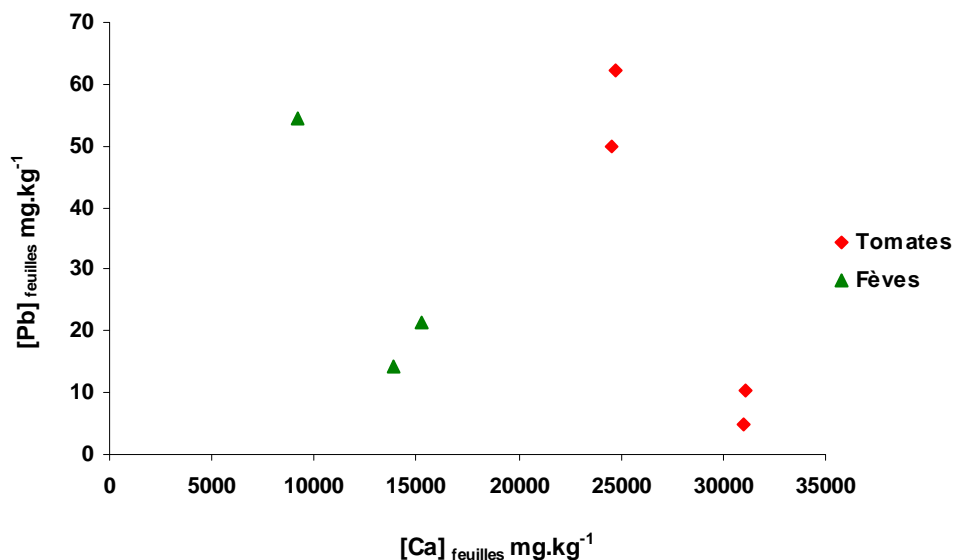


Figure 48 : Teneurs en plomb en fonction des concentrations en calcium dans les feuilles

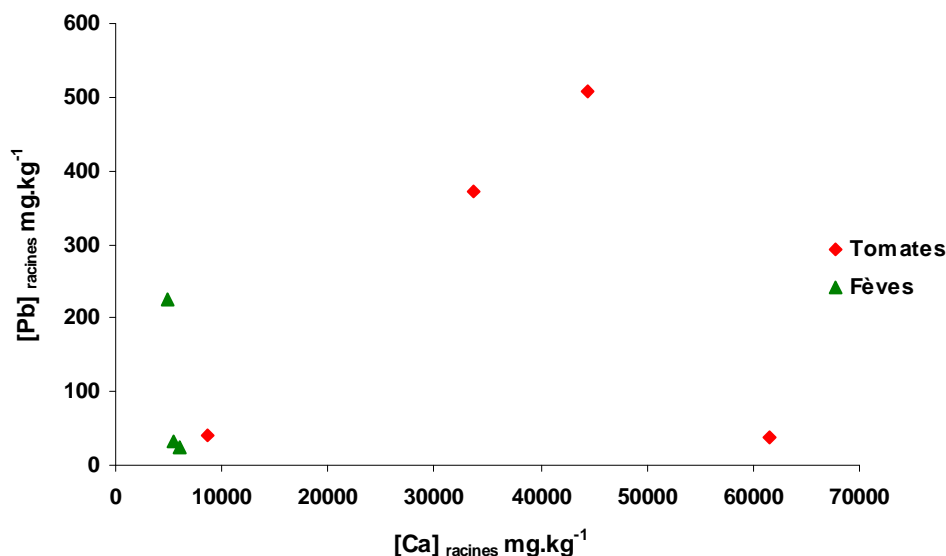


Figure 49 : Teneurs en plomb en fonction des concentrations en calcium dans les racines

La Figure 48 montre que dans les feuilles de fèves, pour les sols peu contaminés (modalités 40-50 cm et 90-100 cm), la teneur en plomb augmente en même temps que la teneur en calcium. Par contre, pour des concentrations plus élevées (horizon 10-20 cm et 0-10 cm), la teneur en calcium diminue alors que la teneur en plomb augmente. Les observations sont identiques pour les feuilles de tomate, pour lesquelles la concentration en calcium diminue avec l'augmentation du plomb, dans les 2 modalités les plus concentrées (avec 50 et 60 mg.kg⁻¹ dans les sols 10-20 cm et 0-10 cm respectivement). Dans les racines de tomates, cette diminution du Calcium avec l'augmentation du plomb est aussi observée (Figure 49), sauf pour le point concernant l'horizon 40-50 cm (qui présente une faible teneur en calcium). Dans les racines de fève (Figure 49), le même phénomène que dans les feuilles est observé, mais dans une moindre mesure, avec une diminution légère du calcium pour la plus forte teneur en plomb.

Ces résultats préliminaires seraient à compléter afin d'acquérir davantage de points de mesure. Cependant, l'ensemble de ces observations pourraient résulter d'un antagonisme entre le plomb et le calcium. Le plomb freinerait l'entrée du calcium dans les cellules. De nombreux auteurs suggèrent cet antagonisme entre Pb et Ca. Pourrut et al. (2008) ont montré que l'ajout de calcium dans le milieu réduisait le stress oxydatif induit par le plomb. L'augmentation de la concentration en calcium dans le milieu accentuerait la compétition (phénomène d'antagonisme) entre le calcium et le plomb, réduisant ainsi la pénétration du plomb dans les cellules. L'utilisation d'un inhibiteur des canaux calciques, le lanthane, réduit fortement le stress oxydatif, confirmant ainsi que le plomb emprunte les canaux calciques (Pourrut et al, 2008). Ce passage du plomb par les canaux calciques peut être rendu possible par la forte affinité du plomb pour les sites de fixation du calcium. C'est pourquoi des concentrations élevées en calcium permettraient d'occuper préférentiellement tous ces sites, et de restreindre la fixation des autres cations, notamment Pb²⁺ (White, 2000 ; Sanders et al., 2002). D'autres auteurs montrent que de fortes concentrations en calcium augmentent la tolérance

des plantes au plomb en réduisant les inhibitions de croissance et les activités enzymatiques (Antosiewicz, 2005 ; Wojas et al., 2007).

Cependant, le calcium n'aurait pas uniquement un effet sur la diminution du prélèvement du plomb, mais également sur une meilleure efficacité des mécanismes de défense des plantes. Des travaux d'Antosiewicz (2005) ont montré que pour une même concentration en plomb dans des tissus végétaux, une plus grande toxicité est observée si les teneurs en Ca sont faibles. L'auteur a mis en évidence un gène qui code pour un transporteur de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} situé sur la membrane plasmique, le LCT1 (Low affinity Cation Transporter) et qui participerait à la régulation de la tolérance en cadmium chez le blé. Des travaux ultérieurs (Wojas et al., 2007) ont montré que ce transporteur était aussi impliqué dans le transport du plomb. L'expression du gène LTC1 ne s'accompagne pas d'une diminution du prélèvement du plomb, mais plutôt d'une meilleure immobilisation du plomb prélevé. Le calcium étant un messenger secondaire, les auteurs suggèrent qu'il déclencherait une cascade de signalisation, afin d'activer les défenses de la plante.

En résumé, le calcium pourrait avoir un rôle dans la protection contre la toxicité du plomb à 2 niveaux différents. Il agirait comme barrière en entrant en compétition avec le plomb, rendant difficile sa pénétration dans la cellule et ce phénomène serait d'autant plus marqué que la concentration en calcium est forte. Le calcium peut également jouer un rôle dans la détoxification du plomb une fois à l'intérieur des cellules en tant que messenger secondaire. Ces deux actions du calcium pourraient expliquer en partie l'absence de toxicité observée sur les plantes cultivées sur des sols riches en carbonates et fortement contaminés en plomb.

PARTIE V : Impact du plomb absorbé par la plante.

Comparaison de deux modes de culture : sol et hydroponie

Cette partie traite de l'étude des mécanismes mis en jeu lors du transfert et de la génotoxicité du plomb dans la plante. La toxicité du plomb a tout d'abord été évaluée par le test des micronoyaux, puis des expériences de suivi du transfert du plomb dans les organes des plantes et dans la sève ont été réalisées, ainsi que des observations des racines en microscopie électronique.

1 Introduction

Après avoir précédemment détaillé les caractéristiques du sol contaminé, ainsi que le comportement du plomb le long du profil de sol, nous nous sommes intéressés aux différents phénomènes qui avaient lieu à l'interface sol-racine pour deux types de plantes très différentes cultivées sur un dispositif de microculture. Nous avons vu que les plantes influençaient fortement les caractéristiques du sol, notamment en diminuant le pH, mais surtout en augmentant fortement la fraction biodisponible (fractions hydrosoluble et échangeable). Nous avons également constaté un transfert du plomb du sol vers les racines assez important avec une fraction apoplastique (adsorbée à la surface des racines) représentant la moitié au moins du plomb retrouvé dans les racines. Par contre, la translocation des racines vers les parties aériennes était limitée quelles que soient les espèces végétales.

Malgré ce transfert sol-plante significatif du plomb, les plantes ne présentaient pas de symptômes visibles de toxicité (pas de variation de biomasse par exemple). Cependant l'apparition de symptômes visibles de toxicité se fait de façon tardive, c'est pourquoi il nous est apparu intéressant d'évaluer les éventuels impacts génotoxiques du plomb par **le test des micronoyaux**. Le caractère génotoxique des polluants représente en effet une des composantes majeures de la toxicité à long terme. Le test sur les apex racinaires de *Vicia faba* notamment, utilisé pour évaluer la qualité des eaux ou des sols, via leurs lixiviats a été normalisé en France par l'AFNOR (NF T90-327, relative à la qualité des sols). Initialement, il était prévu d'utiliser le dispositif de microculture, cependant, la formation du tapis racinaire contraint les racines dans un espace restreint, ce qui empêche son utilisation pour les expériences de génotoxicité. Un mode de culture alternatif a donc été envisagé, et la question de l'utilisation de contact direct avec le sol ou bien de lixiviats de ce sol s'est posée. Dans le même temps, des travaux réalisés au sein du laboratoire ECOLAB ont démontré que pour des temps courts d'exposition de racines de fèves à une solution de plomb à 1 mg.kg^{-1} , on observait une induction du stress oxydatif (Pourrut et al., 2008) et la génération de micronoyaux (Loudes, 2002) s'accompagnant de symptômes visibles (racines noircies, notamment aux extrémités). Tandis que l'exposition des fèves au sol contaminé (travaux présentés en partie IV) ne s'accompagnait d'aucun symptômes de toxicité visibles pour des concentrations en plomb (extractible à l'eau + échangeable) nettement supérieures à 1 mg.kg^{-1} . De plus, la revue bibliographique de la partie I montre l'importance du mode de culture sur les effets du plomb dans la plante.

C'est pourquoi, nous avons voulu comparer l'induction des micronoyaux selon les **2 modes de culture** : (i) par exposition directe avec du sol (contaminé ou non) et (ii) par exposition aux lixiviats de ces mêmes sols. Cette première partie a été réalisée en collaboration avec d'autres travaux de thèse réalisés au laboratoire EcoLab (Marcato, 2007). Conscient du fait que le mode de culture peut avoir une influence sur la physiologie de la plante, et éventuellement sur son métabolisme, des observations au microscope électronique ont été réalisées sur des plantes mises en contact direct avec le sol contaminé, puis comparées à des observations sur des plantes exposées à une solution contenant 1 mg.kg^{-1} de plomb. Le but de ces observations était d'imputer les différences de génotoxicité observées à d'éventuelles différences physiologiques dues au mode de culture, en se

PARTIE V : Impact du plomb absorbé par la plante.

concentrant notamment sur la morphologie des racines. Des prélèvements de sève ont finalement été effectués, afin de doser le plomb, puis cette sève a été analysée en électrochimie, grâce à une électrode spécifique afin de vérifier si la fraction de plomb sous forme ionique (forme qui est suspectée d'être la plus toxique) dans la sève était influencée par le mode de culture.

Les travaux présentés dans cette partie sont à l'état préliminaire, et doivent à l'avenir faire l'objet d'expérimentations supplémentaires afin de confirmer les premiers résultats présentés ici.

2 Matériel et méthodes

2.1 Conditions de l'expérience

Pour atteindre les objectifs de cette étude, deux types de sols ont été utilisés :

(1) L'échantillon 0-10 cm du sol contaminé de Bazoches, présentant une pollution au plomb d'environ 2000 mg.kg⁻¹.

(2) Un sol de référence (LUFA 2.2), utilisé dans 2 cas : (i) comme témoin négatif, car ce sol n'a jamais reçu de produits contaminants, et ses effets génotoxiques ont été reconnus comme nuls par les travaux de Song et al (2006) et (ii) comme témoin positif, après avoir été contaminé artificiellement avec de l'hydrazide maléique à 10⁻⁵ M (molécule préconisée comme témoin positif dans la norme AFNOR).

	LUFA 2.2	Sol de Bazoches	
	Sol de référence	Sol	Lixiviat
C organique (%)	2,33 ± 0,18	3,4	-
pH (eau)	5,7 ± 0,3	6,98	-
CEC (meq/100g)	11 ± 1	15,1	-
Granulométrie (%)			-
Argile (<0,002 mm)	7,9 ± 1,0	20,3	-
Limon (0,002-0,05 mm)	14,2 ± 2,6	52,7	-
Sable (0,05-2,0 mm)	77,9 ± 3,0	21,0	-
Eléments métalliques	mg.kg ⁻¹ MS	mg.kg ⁻¹ MS	µg.L ⁻¹
As	Nd*	28	<ld
Cd	Nd	6	<ld
Cr	Nd	62	<ld
Cu	Nd	34	157 ± 30
Ni	Nd	33	<ld
Pb	16.9	1933	391 ± 40
Zn	Nd	87	<ld

* Nd : non déterminé

Tableau 15 : Caractéristiques des sols utilisés lors de l'essai de génotoxicité

Les plantes sont soit cultivées en contact direct avec le sol soit cultivées en hydroponie, dans une lixiviation de ces mêmes sols (Figure 50). La lixiviation est réalisée selon la norme NF EN 12457-2 (AFNOR, 2002), en mélangeant le sol avec de l'eau déminéralisée, avec un rapport solide/solution 1 :10 (en volume), sous agitation pendant 24h. Le surnageant est ensuite prélevé après 24h de décantation avant d'être utilisé pour les expériences d'exposition des plantes en hydroponie.

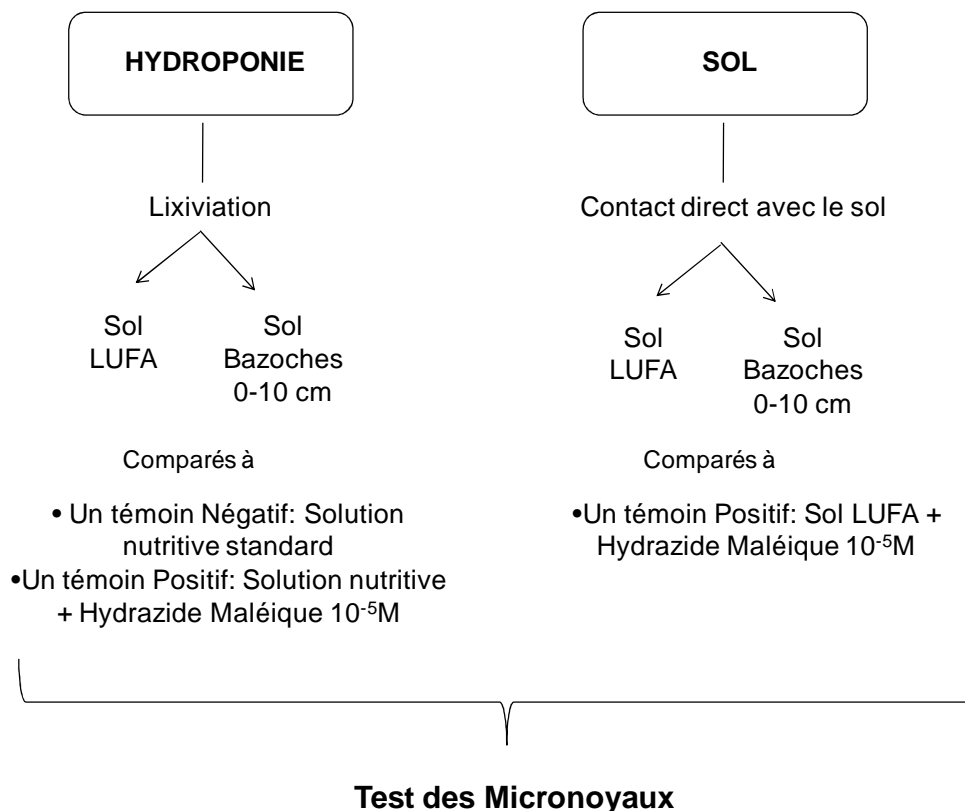


Figure 50 : Méthodologie adoptée pour l'évaluation des effets génotoxiques du plomb

2.2 Test des micronoyaux

Le test des micronoyaux n'est pour l'instant normalisé qu'en milieu liquide (la norme AFNOR NF T90-327). Suivant cette norme, les graines, conservées à l'obscurité en chambre froide (4°C) ont été écosées après 24h d'hydratation à température ambiante, puis désinfectées au moyen d'hypochlorite de calcium ($CaClO$ 0,9%, 15 minutes) et rincées à l'eau déminéralisée avant d'être mises à germer verticalement, à 24°C dans du coton constamment humidifié (Figure 51). Après 3 jours, les graines dont la longueur de la racine primaire était comprise entre 3 et 5 cm ont été sélectionnées, et les extrémités de ces racines ont été coupées (5 mm environ) de façon à favoriser le développement des racines secondaires. Ensuite deux méthodologies sont suivies selon que l'on mène la culture en sol ou en hydroponie. Pour chaque modalité, cinq répétitions ont été réalisées.

2.2.1 Test en hydroponie

Pour le test en hydroponie, les graines ont alors été placées dans le milieu nutritif préalablement oxygéné (solution de Hoagland dont la composition est donnée en annexe 3), à 22°C. Le test a lieu après 5 jours : lorsque les racines secondaires ont une longueur de 1 à 2 cm.



Figure 51 : photos de graines de *Vicia faba* en phase de germination (à gauche), puis en hydroponie au phytotron (à droite)

Les racines de cinq plantes ont été immergées dans un récipient contenant la solution d'exposition. Les récipients ont ensuite été placés à 24 °C pendant 30 heures et à l'obscurité, de façon à préserver les racines de tout stress lié aux rayons ultraviolets. Les solutions d'exposition sont oxygénées au moyen de bulleur afin d'éviter tout risque d'anoxie.

La solution de Hoagland a été utilisée comme témoin négatif, et a également servi à la préparation du témoin positif par une dilution d'hydrazide maléique (HM) à 10^{-5} M. En fin d'exposition, les racines ont été rincées à l'eau déionisée. Pour chaque plante, les extrémités (environ 2 cm) d'une douzaine de racines secondaires ont été coupées et placées une nuit à 4°C dans une solution de Carnoy (mélange d'acide acétique glacial et d'éthanol en proportion 1:3), qui permet la fixation des cellules racinaires en l'état. Pour l'observation, après 10 minutes dans l'eau déminéralisée, les racines ont été hydrolysées dans l'acide chlorhydrique (HCl 1 N) pendant 6 minutes à 60°C. L'ADN des racines hydrolysées a ensuite été coloré à l'orcéine (pendant 3 minutes à 60°C). Pour la préparation des lames de microscope, les apex (extrémités radiculaires) de 6 racines différentes ont été observés pour chaque plante. Les observations ont été réalisées au moyen d'un microscope Olympus BX41 avec un grossissement x 40 équipé d'une camera Q imaging FA1394-RETIGA Exi permettant un comptage différé.

2.2.2 Test des micronoyaux par exposition directe au sol

La préparation des graines (hydratation, germination) s'est déroulée de la même façon que pour les expériences en hydroponie, selon le protocole de la méthode normalisée. En revanche, lorsque la racine primaire a été coupée, la fève a été placée directement dans le sol d'exposition. Le sol LUFA 2.2 a été utilisé comme témoin négatif, mais également comme matrice support pour le témoin positif.

Dans le cas du témoin négatif, le sol a été humidifié aux deux tiers de la capacité de rétention en eau avec de l'eau déminéralisée. Dans le cas du témoin positif, l'humidification du sol s'est fait avec la solution d'hydrazide maléique à 10^{-5} M. Puis les plantes ont été placées en phytotron (cycles de 16 heures de jour à 24°C et 8 heures de nuit à 20°C, avec une humidité de 75%). Au cours des

périodes d'exposition, l'humidité du sol a été contrôlée par pesée et maintenue aux 2/3 de la capacité par ajout d'eau pour le témoin négatif et le sol de Bazoches, et par ajout de solution d'hydrazide maléique pour le témoin positif. Après exposition, les racines sont récoltées et traitées selon la méthode normalisée.

Le test des micronoyaux en sol ne bénéficiant d'aucune norme pour le moment, il a donc fallu adapter le temps d'exposition des plantes au sol contaminé. Nous avons choisi 48h, pour rester proche des conditions du test normalisé en milieu liquide, tout en laissant du temps pour obtenir un développement suffisant des racines.

2.2.3 Statistiques

Pour chacune des méthodologies utilisées (normalisée ou par contact direct), il faut procéder au dénombrement des cellules en division (mitose) afin de calculer : (a) un index mitotique (IM, exprimé en %) ou pourcentage de cellules en mitoses ; (b) la fréquence de micronoyaux (MN, exprimée en ‰). Ceci a été réalisé grâce au logiciel Explora nova morpho. L'indice mitotique et la fréquence de micronoyaux ont été calculés pour chaque plante, après observation d'environ 2500 cellules. Pour être pris en compte, les micronoyaux ne doivent ni excéder les deux tiers de la taille du noyau, ni être en contact avec ceux-ci. De plus, il doit y en avoir un seul par cellule (Zang *et al*, 2000).

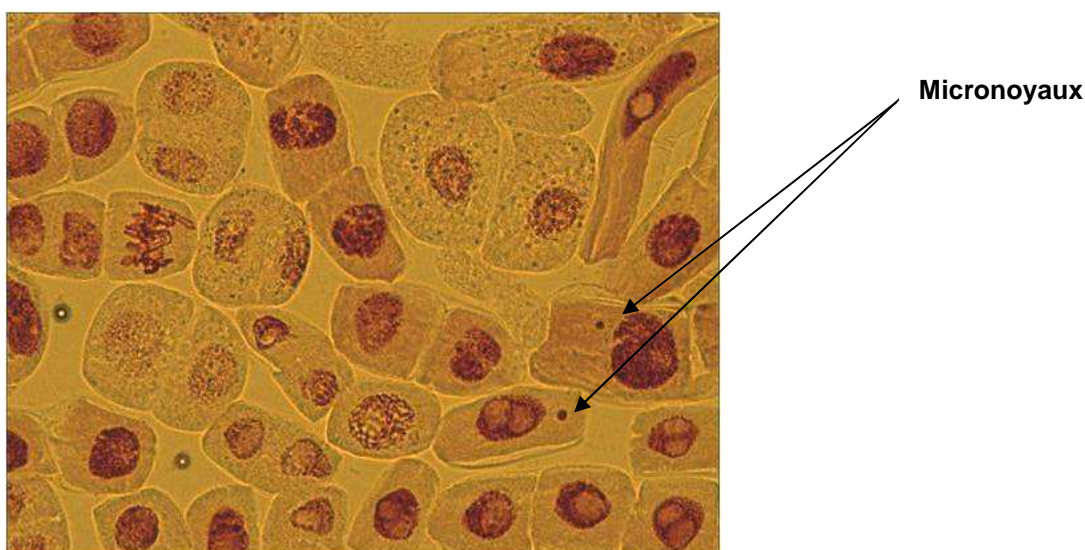


Figure 52 : Cellules racinaires de *Vicia faba* après préparation selon le protocole normalisé.

Le test est soumis à deux critères de validité:

- L'indice mitotique doit être supérieur à 2%. Cela signifie que l'on est bien dans une zone de division cellulaire (Ma *et al.*, 1995). Un indice mitotique inférieur à 2% peut signifier que l'on n'est pas dans une zone de division cellulaire, mais il peut aussi signifier que le polluant testé n'est plus dans une gamme de concentrations génotoxiques, mais plutôt de concentrations cytotoxiques, qui provoquent une diminution de la division cellulaire. Pour cela, toutes les phases de la mitose ont été considérées, de la prophase à la télophase.

- Le témoin positif doit donner un nombre de micronoyaux significativement supérieur au témoin négatif. La significativité des résultats a été déterminée par analyse de variance selon une méthode non paramétrique (test de Kruskal-Wallis couplé au test de comparaison de Dunn), les probabilités P inférieures à 0,05 étant considérées comme significatives. Lorsqu'une modalité donne une moyenne de micronoyaux significativement supérieure à celle du témoin négatif, cette modalité répond positivement au test. Le résultat est alors mentionné dans les tableaux avec un astérisque.

2.3 Transfert sol/plante

De manière à estimer la relation de cause à effet entre la présence de plomb dans les tissus et la formation de micronoyaux, des dosages du plomb dans les racines et les parties aériennes des plantes ont été réalisés. Ces dosages ont été effectués selon la méthode de minéralisation décrite dans la partie II, sur les plantes ayant servi aux tests de génotoxicité. En effet, l'amplitude des réponses quant à l'induction de micronoyaux dans les apex racinaires étant différente en sol et en hydroponie, nous avons voulu voir si le plomb était prélevé par la plante dans les mêmes proportions ou si une différence dans le transfert était induite par le mode de culture.

2.4 Microscopie

Après une période de quelques jours de croissance en hydroponie, des fèves sont exposées à 4 conditions différentes pendant 5 jours :

- Témoin Hydroponie (solution nutritive standard)
- Témoin sol (exposition directe à du sol non contaminé)
- Pb Hydroponie (exposition à une solution à 1 mg.kg⁻¹ de Pb(NO₃)₂)
- Pb sol (contact direct avec le sol de surface de Bazoches)

Pour chaque condition, des échantillons de tiges, de feuilles et de racines sont prélevés et préparés afin de pouvoir être observés en microscopie. Ces observations nécessitent la réalisation de coupes fines, les échantillons devant alors être inclus dans de la résine solide. Ils subissent d'abord une étape de fixation dans du tampon Cacodylate 0.05M à pH 4.7, additionné de glutaraldéhyde 2.5%. Ensuite, ils doivent être progressivement déshydratés, grâce à des bains successifs d'éthanol, en concentrations croissantes (de 20 à 100%), puis plongés progressivement dans la résine LR White (medium grade anylic resin), afin de réaliser l'inclusion des échantillons. On débute avec 1/3 de résine et 2/3 d'éthanol, puis 2/3 de résine et 1/3 d'éthanol et enfin 100% résine. Ensuite, les échantillons sont déposés dans des gélules, contenant de la résine pure, puis placés au four à 70°C pendant une nuit, afin de faire polymériser la résine. Après refroidissement des gélules, des coupes semi-fines sont réalisées à l'aide d'un couteau diamant histo (Leica microsystems). Ces coupes sont réalisées à l'IFR 40 à l'INRA d'Auzeville-Tolosane en collaboration avec Alain Jauneau. Les coupes sont ensuite déposées sur des lames et colorées au bleu de Toluidine 0.1%. Cette coloration permet une visualisation des structures à l'échelle tissulaire, par observation en microscopie optique. Les

tissus prennent une couleur variable en fonction de leur composition et de leur acidité. Les parois des tissus lignifiés par exemple apparaissent bleu foncé intense, les parois riches en pectine acide quand à elles apparaissent plus claires et peuvent prendre des teintes roses.

2.5 Analyses de sève

Des plantes âgées d'environ 2 semaines (afin d'obtenir une tige assez large pour l'expérience) sont exposées aux 4 conditions précédentes, c'est-à-dire soit en hydroponie (avec ou sans Pb) soit en contact direct avec le sol (avec ou sans Pb). La durée d'exposition est de 48h pour être proche des conditions expérimentales du test des micronoyaux.

Après exposition, les tiges sont sectionnées juste au-dessus des cotylédons, puis un dispositif est mis en place au niveau de la section, afin de pouvoir tirer la sève sous vide (à l'aide d'une seringue). Chaque échantillon de sève ainsi récolté a été scindé en deux, de manière à doser d'une part le plomb total et d'autre part le plomb ionique.

Après dilution, un dosage du plomb est réalisé à l'ICP-OES pour connaître la concentration en plomb total dans la sève. Les dosages à l'ICP-OES ont été réalisés sans filtration préalable, pour ne pas éliminer le plomb lié à des formes organiques. Ces associations sont ensuite détruites dans le plasma d'argon où la température est très élevée (10000K).

Un dosage par électrochimie a également été réalisé, au laboratoire **Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement de l'université de Pau (UPPA)**, grâce à Mr A. Castetbon. Les conditions de mesure en électrochimie étaient les suivantes. L'électrolyte support utilisé était du KCl 0.1M, et 0.5 cm³ d'échantillon ont été utilisés. La technique utilisée est l'ASV ou voltampérométrie à redissolution anodique. Le temps de pré-électrolyse était de 300 secondes suivi de 30 secondes d'équilibrage, avec une déposition à -0.6 V par rapport à l'électrode d'argent, puis un balayage de -0.6 à -0.1 V à 5 mV/seconde. Chaque échantillon a été dosé 3 fois, et des blancs systématiques ont été passés entre chaque échantillon.

Ces deux dosages ont pour objectif la mise en évidence d'éventuelles différences selon le mode d'exposition (sol ou hydroponie) au niveau des concentrations totales en plomb ou de la fraction libre du plomb dans la sève.

3 Résultats

3.1 Test des micronoyaux

Les résultats obtenus par le test des micronoyaux effectué selon la norme AFNOR (par exposition aux lixiviats de sol) sont présentés dans le Tableau 16.

PARTIE V : Impact du plomb absorbé par la plante.

Lixiviats	Indice mitotique (%) \pm SD (n=5)	Micronoyaux (‰) \pm SD (n=5)
Témoin négatif	9,6 \pm 3,2	3,2 \pm 0,5
Témoin positif HM (HM 10 ⁻⁵ M)	6,1 \pm 2,0*	22,1 \pm 7,9*
LUFA 2.2	9,3 \pm 1,7	3,5 \pm 3,2
Sol Bazoches	15,0 \pm 3,5*	18,5 \pm 4,4*

Tableau 16: Résultats du test des micronoyaux après exposition à des lixiviats

Concernant l'IM, on constate que pour toutes les conditions de l'expérience, le seuil de 2% est atteint. L'exposition des fèves aux lixiviats n'a donc pas induit d'effet sur la division cellulaire. Cependant, on peut noter une diminution du nombre des mitoses dans le cas du témoin positif, même si elles n'invalident pas le test. L'hydrazide maléique pourrait légèrement perturber la division cellulaire tout en restant dans la zone de validité du test.

Concernant l'induction des micronoyaux, l'innocuité du sol LUFA 2.2 est confirmée, en effet le nombre de micronoyaux induit par le lixiviat de ce dernier est le même que pour le témoin négatif. Le témoin positif présente, lui, une induction très importante de micronoyaux (22,1 ‰ contre 3,2 ‰ pour le témoin négatif).

Le sol de Bazoches présente également une forte génotoxicité dans ces conditions, puisqu'il induit la formation de 18,5 ‰ cellules micronucléées, ce qui représente une multiplication par 6 par rapport au témoin négatif.

Les résultats concernant le test réalisé après contact direct avec le sol sont présentés dans le Tableau 17 ci-dessous.

	Indice mitotique (%) \pm SD (n=5)	Micronoyaux (‰) \pm SD (n=5)
Contact direct 2 jours		
Témoin négatif (LUFA 2.2 + eau)	13,5 \pm 3,1	0,08 \pm 0,18
Témoin positif HM (LUFA 2.2 HM 10 ⁻⁵ M)	7,3 \pm 4,3	24,65 \pm 7,50 *
Sol de Bazoches	12,5 \pm 2,2	0,84 \pm 0,43 *

Tableau 17: résultats du test des micronoyaux après 2 jours de contact direct avec le sol

Les plantes ne présentent pas de signe de toxicité, les indices mitotiques étant toujours supérieurs à 2%. Cependant, on peut noter que l'indice mitotique du témoin positif à l'hydrazide maléique est réduit après les 2 jours d'exposition, de la même façon qu'il l'a été pour les racines exposées aux lixiviats.

Les résultats concernant l'induction de micronoyaux montrent l'absence de génotoxicité du témoin négatif (sol LUFA 2.2), avec un nombre de micronoyaux très faible (0,08 ‰). Pour le témoin

positif, on constate une très forte induction de micronoyaux, qui atteint le même ordre de grandeur qu'en hydroponie (24,65 ‰ en sol et 22,1 ‰ en hydroponie). Pour le sol de Bazoches, on note une induction significative des micronoyaux par rapport au témoin négatif, avec une multiplication du pourcentage de micronoyaux par 10 (0,08 ‰ pour le témoin négatif et 0,84 ‰ pour le sol de Bazoches). Mais il faut toutefois rester prudent dans l'interprétation de ces ratios calculés en sol. En effet, le nombre de micronoyaux est très faible (0.08 ‰) et correspond à 1 micronoyau trouvé dans l'ensemble des 12500 cellules dénombrées (2500 cellules par répétition).

Un effet génotoxique du plomb a donc été observé sur les plantes dans les 2 types d'exposition. Ce phénomène a déjà été observé par d'autres auteurs (Steinkeller et al., 1998 ; Chandra et al., 2004 ; Song et al., 2007). Selon ces auteurs, les mécanismes d'action de ce métal seraient liés à l'inactivation des enzymes par liaison aux résidus –SH de la cystéine, entraînant un blocage du groupe fonctionnel de certaines enzymes.

Si pour les 2 types d'exposition (contact avec le lixiviat ou contact direct avec le sol), le sol de Bazoches induit 6 à 10 fois plus de micronoyaux que chaque témoin négatif respectif, la comparaison entre ces 2 expériences soulève des questions. En effet, l'intensité des réponses du test des micronoyaux est beaucoup plus faible lorsqu'ils sont exposés directement à un sol contaminé (0,84 ‰) que lorsqu'ils sont exposés à un lixiviat de ce même sol (18,5 ‰). Le rapport des 2 réponses au plomb est de 22, et celui des 2 témoins négatif est de 40. Des résultats similaires dans l'intensité de l'induction de micronoyaux ont déjà été mis en évidence. En effet, Chandra et al. (2004), qui ont travaillé sur des sols contaminés par une tannerie, ont observé une fréquence d'apparition des micronoyaux supérieure en cas d'exposition aux lixiviats de ces sols plutôt qu'à ces sols directement. On peut tout de même s'interroger quant à la validité et la représentativité des résultats obtenus en sol, au vu des très faibles valeurs obtenues dans le cas d'une exposition directe au sol. Il semble important de ne pas comparer les valeurs absolues des résultats obtenus selon les deux modes de culture, mais plutôt les valeurs comparées à leur témoin négatif respectifs.

Dans le même temps, l'hydrazine maléique induit une réponse équivalente dans les 2 types d'exposition (22 et 25 ‰ pour l'exposition au lixiviat et l'exposition au sol respectivement). Une hypothèse pour expliquer ces observations pourrait s'appuyer sur les différences de comportements dans le sol entre le plomb et l'hydrazide maléique. Le plomb est un métal de transition, il est susceptible de contracter des liaisons hydrophiles avec les constituants du sol alors que l'hydrazide maléique composé organique peu retenu par les constituants des sols : le sol aurait alors peu d'influence sur l'induction de micronoyaux dans la plante par l'HM. Dans le cas d'une contamination au plomb susceptible de se lier aux constituants du sol, au contraire, le fait que la plante soit cultivée dans un milieu liquide ou solide influence considérablement sa réaction.

Les différences dans les résultats pourraient venir aussi de la différence de contact entre la matrice contaminée et les racines. Dans le cas de l'exposition en hydroponie, la répartition du plomb est homogène, et la totalité des racines est exposée. Par contre, dans le sol, la répartition est beaucoup plus hétérogène, et la surface de contact entre le plomb et les racines est de ce fait beaucoup plus faible qu'en hydroponie.

C'est pourquoi, afin de vérifier si les différences observées dans l'induction de micronoyaux obtenues selon les deux modes d'exposition sont induites par des différences de doses absorbées par les plantes, des mesures de concentrations totales en plomb dans les plantes (ayant subi le test des micronoyaux) ont été réalisées.

3.2 Transfert sol/plante

Le Tableau 18 et le Tableau 19 présentent les teneurs dans les racines et dans les parties aériennes des plantes cultivées en hydroponie et en sol respectivement, ainsi que les Facteurs de Translocation (TF) tels qu'ils sont définis dans la revue bibliographique.

	[Pb] mg.kg ⁻¹		
	Racines	Feuilles	TF
Témoin	0.40 ± 0.2	0.006 ± 0.01	0.015
Plomb	129.5 ± 37.3*	0.84 ± 0.5	0.006

Tableau 18 : Teneurs en plomb et translocation (TF) dans les végétaux après 30h d'exposition aux lixiviats

	[Pb] mg.kg ⁻¹		
	Racines	Feuilles	TF
Témoin	9.34 ± 5.8	1.77 ± 1.2	0.19
Plomb	192.35 ± 90.7*	6.43 ± 3.3*	0.033

Tableau 19 : Teneurs en plomb et translocation (TF) dans les végétaux après 2 jours de contact direct avec le sol contaminé

Les résultats montrent tout d'abord que quelque soit le mode d'exposition, les teneurs en plomb les plus fortes sont mesurées dans les racines des plantes. La séquestration du plomb dans les racines a déjà été bien décrite dans la partie IV. Dans la majorité des plantes, le plomb est principalement retrouvé dans les racines. Tomaszewska et al. (1996) ont cité des accumulations de 90 à 95% du plomb dans les racines de la fève et du haricot.

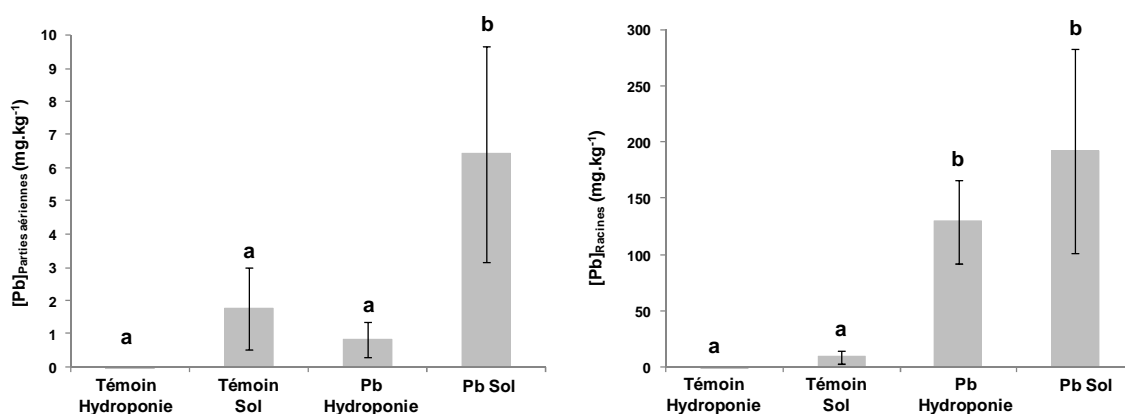


Figure 53 : Concentrations en plomb total dans les feuilles et les racines (mg kg⁻¹MS) des fèves selon les deux modes de culture.

On constate que les teneurs en plomb dans les racines sont élevées puisqu'elles atteignent 129.5 mg.kg⁻¹ dans les plantes exposées aux lixiviats pendant 30h, et 192.35 mg.kg⁻¹ dans les plantes en contact direct avec le sol pendant 48h. De plus, ces teneurs dans les racines ne sont pas significativement différentes selon le mode de culture (Figure 53). Le transfert du plomb vers les plantes semble donc équivalent que la culture ait lieu en sol ou en hydroponie. Cependant, il n'a pas été réalisé de désorption à l'acide dilué lors de ces expériences, or la partie précédente montre clairement qu'une très large partie du plomb pouvait être adsorbée à la surface des racines. Il est possible que malgré des teneurs équivalentes dans les deux modes de culture, le plomb ne soit pas localisé au même endroit dans les racines. Il pourrait ainsi impacter différemment sur la plante.

Pour les parties aériennes, il existe une différence significative dans la translocation du plomb des racines vers les parties aériennes, avec une concentration moyenne de 0.84 mg.kg⁻¹ en hydroponie et de 6.43 mg.kg⁻¹ en sol. Les facteurs de translocation (Partie IV) reportés sur les Tableau 18 et Tableau 19 sont toujours plus importants dans les plantes cultivées en sol qu'en hydroponie. Le passage du plomb des racines vers les parties aériennes est donc augmenté dans le cas d'une exposition directe au sol. Ces résultats montrent donc des teneurs similaires dans les racines quelque soit le mode de culture, contrairement à celles des parties aériennes. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

Ceci peut suggérer une différence dans la spéciation du plomb au niveau des racines. En effet, si le plomb n'est pas sous la même forme dans le cas du sol ou de l'hydroponie, il est possible que la translocation soit modifiée. Selon Liu et al. (2003), les différences dans la translocation vers les parties aériennes peuvent s'expliquer par des éventuelles différences dans les formes du plomb dans la plante. Des études ont montré que la présence de ligands organiques dans le milieu de culture augmente le prélèvement du plomb et que les complexes qu'ils forment avec le plomb sont mobiles dans les plantes, permettant la translocation vers les parties aériennes. De très nombreuses études démontrent l'efficacité de l'application de ligands synthétiques tels que l'EDTA ou le DTPA qui provoquent une augmentation du plomb prélevé par les plantes (Vassil et al., 1998 ; Hammer et

Keller, 2002 ; Ruley et al., 2006 ; Cui et al., 2007). Vassil et al. (1998) démontrent que l'EDTA chélate le plomb à l'extérieur de la plante, puis que le complexe Pb/EDTA est transporté à travers la plante, via le xylème, puis s'accumule dans les feuilles. Cette présence de complexes Pb/EDTA dans des feuilles a été démontrée par Sarret et al. (2001) chez *Phaseolus vulgaris*. Les mécanismes mis en jeu dans le prélèvement des chélates par la plante ne sont pas complètement élucidés, ce complexe étant trop gros pour diffuser à travers les membranes. Il est suggéré que ces chélates pénètrent par des zones qui ne sont pas encore subérisées, ou bien par des cassures qui pourraient exister dans l'endoderme, au niveau des bandes de Caspary (Vassil et al., 1998 ; Lestan et al., 2007). Après avoir pénétré dans l'endoderme, les complexes Pb/EDTA peuvent passer dans le xylème et suivre le flux transpiratoire (Vassil et al., 1998, Tatar et al., 1999).

Certaines études démontrent que les acides organiques de faible poids moléculaires (LMWOA) exsudés par les racines des plantes pourraient jouer le même rôle que les molécules synthétiques. En effet, ces molécules peuvent modifier de façon significative les propriétés physico-chimiques de la rhizosphère, par acidification, chélation, précipitation ou réactions d'oxydo-réduction (Marschner, 1995 ; Ruley et al., 2006 ; Evangelou et al., 2007). Ceci peut en conséquence modifier les caractéristiques du plomb initialement adsorbé sur différents constituants du sol. Ces acides organiques tels que l'acide malique, citrique, tartrique, oxalique, pourraient donc provoquer des réactions de dissolution, puis former des complexes solubles Pb/Acide organique plus mobiles et biodisponibles (Renella et al., 2004 ; Cui et al., 2007). Ces complexes pourraient alors également pénétrer dans l'endoderme, puis être transloqués des racines vers les feuilles, via la sève. Il est possible que lors d'exposition en hydroponie, la sécrétion de ces acides organiques soit différente. En effet, en milieu liquide, l'aération des racines ainsi que la disponibilité des éléments nutritionnels sont extrêmement différents par rapport au milieu solide qu'est le sol (Jones, 1998). Ceci pourrait expliquer les différences de translocation observées. Des auteurs tels que Halim et al (2003) ou Evangelou et al (2007) mettent en évidence que les substances humiques (notamment les acides humiques) sont également capables de former des complexes stables avec le plomb, et donc d'être plus facilement prélevés par les racines.

Les racines des plantes exposées aux lixiviats présentaient des apex racinaires légèrement brunis. Ces symptômes visibles peuvent être les témoins d'une altération de processus physiologiques au sein des racines, qui n'aurait pas lieu dans le cas d'un contact direct avec le sol. Ces différences pourraient également avoir une influence sur la circulation du plomb dans la plante. En tenant compte de l'hypothèse de la pénétration du plomb en compétition avec celle du calcium, l'apex est alors le lieu d'absorption privilégié (lieu où les bandes de Caspary ne sont pas encore formées). Le stress oxydatif serait donc beaucoup plus important à cet endroit des racines, expliquant l'apparition des symptômes visibles, et la génération des micronoyaux.

De plus, comme nous l'avons mentionné précédemment, la surface de contact entre la racine et le plomb est homogène et totale en hydroponie, alors qu'elle l'est beaucoup moins en sol. Ceci peut entraîner un afflux de plomb très rapide en hydroponie, empêchant la plante de mettre en place des défenses, ce qui pourrait provoquer notamment cette augmentation de la génotoxicité. En sol, au

contraire, l'arrivée de plomb pourrait être plus progressive, du fait de l'hétérogénéité de sa répartition et des coefficients de diffusion plus faibles. Ceci pourrait laisser à la plante le temps de mettre en place des stratégies de défense, comme notamment une sécrétion accrue d'acides organiques, qui sont connus pour être sécrétés en plus grande quantité en cas de stress (Jones et Darrah, 1995 ; Evangelou et al., 2007).

Pour compléter cette étude de l'impact du plomb sur *Vicia-faba* et rechercher des éléments supplémentaires de compréhension des mécanismes mis en jeu, des mesures de concentration en plomb dans la sève et des observations en microscopie ont été réalisées pour les deux modes d'exposition.

3.3 Dosage du plomb dans la sève

	[Pb] mg.L ⁻¹
Témoin Hydroponie	0.10
Témoin Sol	0.18
Pb Hydroponie	0.26
Pb Sol	0.62

Tableau 20 : Teneurs en plomb total dans la sève des *Vicia faba* cultivées en sol et en hydroponie (dosage par ICP-OES).

Les teneurs en plomb dans la sève sont faibles et relativement équivalentes dans les 2 témoins (0.10 et 0.18 mg.L⁻¹ pour l'hydroponie et le sol respectivement). Concernant les plantes exposées au plomb, la concentration dans la sève est plus élevée dans le cas des plantes exposée directement au sol, avec 0.62 mg.L⁻¹ contre 0.26 mg.L⁻¹ dans les plantes exposées aux lixiviats de sol.

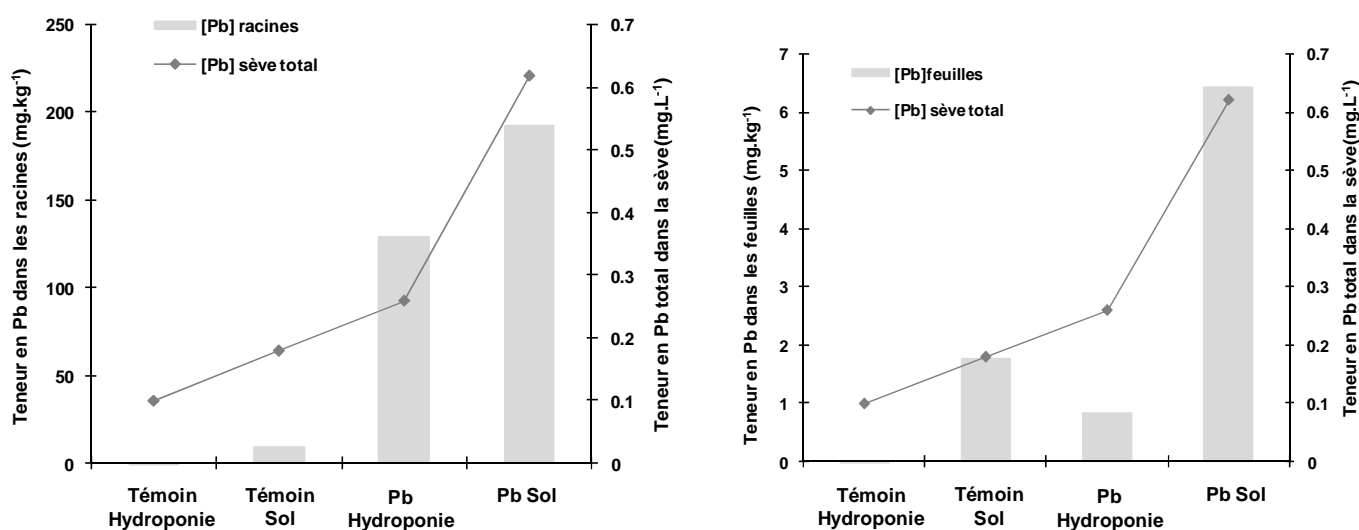


Figure 54 : Comparaison des concentrations en plomb dans la sève selon les deux modes de culture

PARTIE V : Impact du plomb absorbé par la plante.

Ces résultats concordent avec les translocations observées précédemment. En effet, les teneurs en plomb dans les parties aériennes sont plus élevées dans le cas des plantes cultivées en sol, ce qui est cohérent avec des teneurs plus élevées dans la sève. Cependant, ces résultats sont à nuancer en raison du manque de répétitions effectuées. En effet, l'extraction de sève fournit un volume très faible comparé aux volumes exigés par les techniques analytiques. C'est pourquoi, afin d'éviter des dilutions trop importantes qui auraient pu conduire à des valeurs inférieures au seuil de détection, des pools de sève ont été réalisés, ce qui a entraîné un manque de répétitions. En conséquence, il serait judicieux de réaliser une nouvelle fois ces extractions, avec un nombre plus important de plantes, afin de confirmer ces premières observations.

Reportés dans la Figure 54, les teneurs totales en plomb dans la sève suivent les mêmes tendances que les concentrations dans les tissus végétaux. Ces tendances étant toutefois très approximatives, nous avons cherché à les préciser en abordant la spéciation du plomb dans la sève.

	[Pb] $\mu\text{g.L}^{-1}$
Témoin Hydroponie	<1
Témoin Sol	41
Pb Hydroponie	4
Pb Sol	82.8

Tableau 21 : Teneurs en plomb libre et labile dans la sève des *Vicia faba* cultivées en sol et en hydroponie.

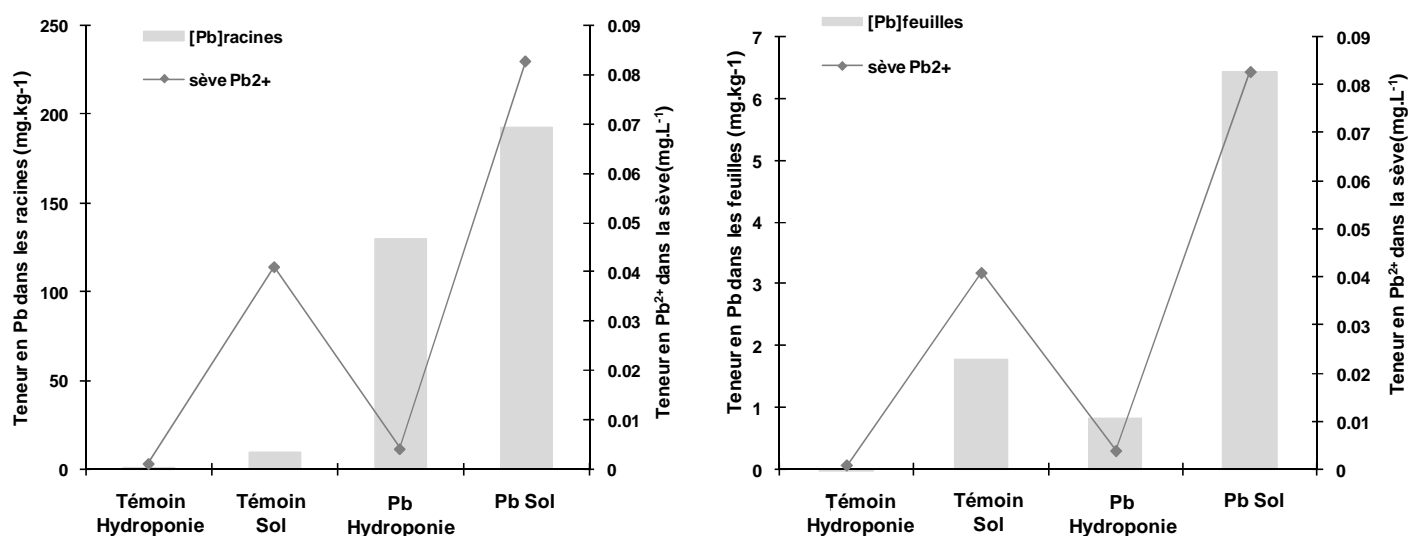


Figure 55 : Comparaison des concentrations en plomb libre et labile dans la sève (mg L⁻¹) et du plomb total dans les feuilles et les racines (mg kg⁻¹ MS)

Les dosages du plomb dans la sève en électrochimie grâce à une électrode spécifique pour le plomb ont donné des concentrations en plomb de 83 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les plantes ayant été en contact

direct avec le sol, et de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour les plantes exposées aux lixiviats. On aurait pu s'attendre à des résultats inverses, c'est-à-dire plus de plomb libre dans le cas de l'hydroponie, car c'est dans ce mode de culture que l'on observe le plus de toxicité. Cependant, l'électrochimie est une méthode qui permet de doser le plomb libre (Pb^{2+}), mais qui dose en même temps le plomb labile (lié par des liaisons faibles). Dans le cadre de nos travaux, si nous posons comme hypothèse majeure la chélation à des acides organiques pour expliquer les différences observées selon le mode de culture, il est possible que ce plomb soit décomplexé lors du dosage. Cette technique ne nous apportant ainsi pas d'information complémentaire aux dosages de plomb total. Un dosage par chromatographie ionique serait plus adapté car la cinétique d'analyse est plus rapide (3 secondes pour la chromatographie ionique contre 300 secondes pour l'électrochimie) et limite donc la décomposition des complexes labiles.

En revanche, la teneur en Pb libre et labile dans la sève explique relativement bien les concentrations en plomb que l'on retrouve dans les feuilles de fèves (Figure 55). Ceci montre bien que cette méthode de dosage est pertinente pour quantifier le transfert du plomb des racines vers les parties aériennes. Ce transfert est plus important en sol qu'en hydroponie, même lorsqu'on a affaire à un sol non contaminé contenant 17 mg Pb.kg^{-1} sol. Même si dans ce cas là, le pH acide de ce sol (5.7) a pu favoriser le transfert, sans pour autant produire de micronoyaux. Le plomb labile que l'on retrouve dans la sève est alors plus important que dans le cas d'un lixiviat de sol très contaminé. Ce résultat est étonnant, mais il confirme les variations de plomb dans les feuilles.

3.4 Microscopie

A partir des inclusions réalisées des coupes semi-fines ont été réalisées. Ces coupes ont été réalisées sur les racines de *Vicia faba*, exposées ou non au plomb, selon les 2 modes de culture.

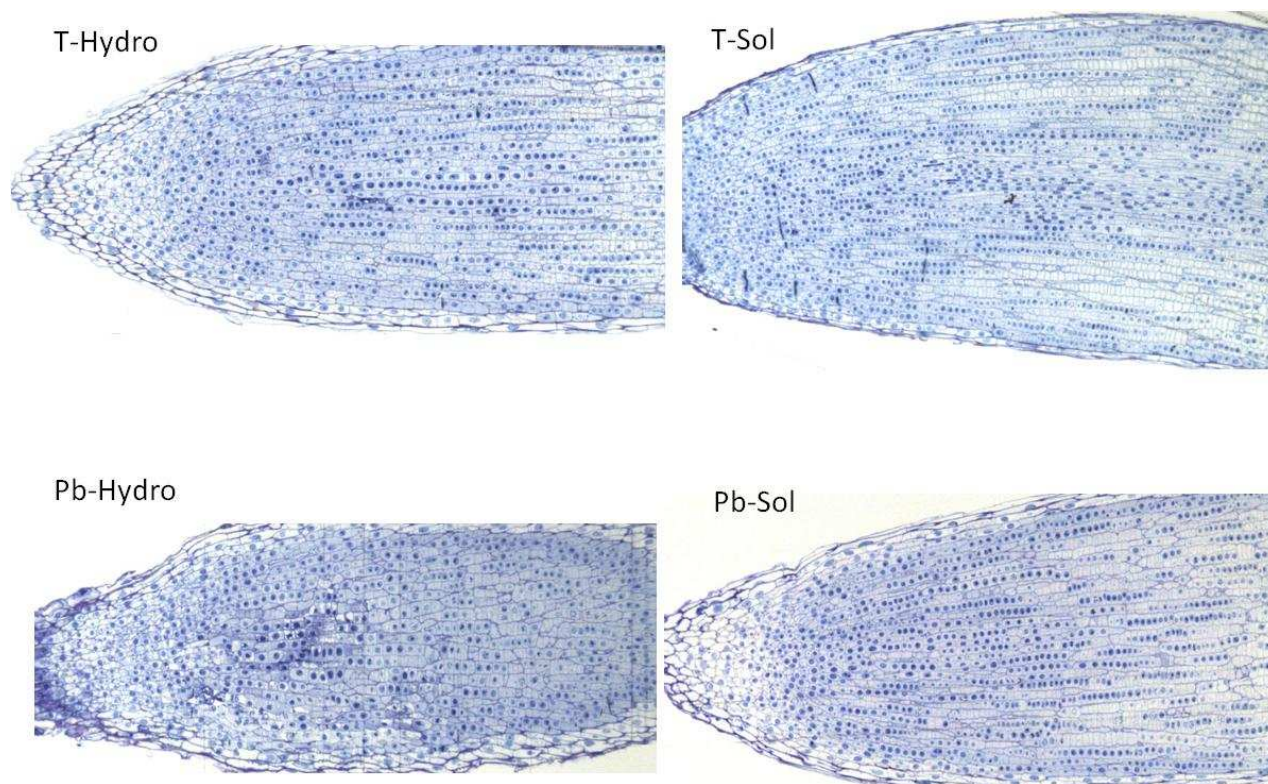


Figure 56 : Apex racinaires de *Vicia faba* observés au microscope, au grossissement x100

Les observations réalisées à un faible grossissement montrent des structures semblables pour les 4 échantillons de racines différents (Figure 1). Des observations à des grossissements plus élevés (Figure 57 à Figure 60) n'ont pas non plus révélé de différences majeures dans la physiologie et le développement des plantes cultivées en sol et celles cultivées en hydroponie. De plus, les coupes n'ont pas non plus permis de mettre en évidence d'effets du plomb sur ces mêmes racines, malgré un brunissement visible des racines exposées à la solution plombée.

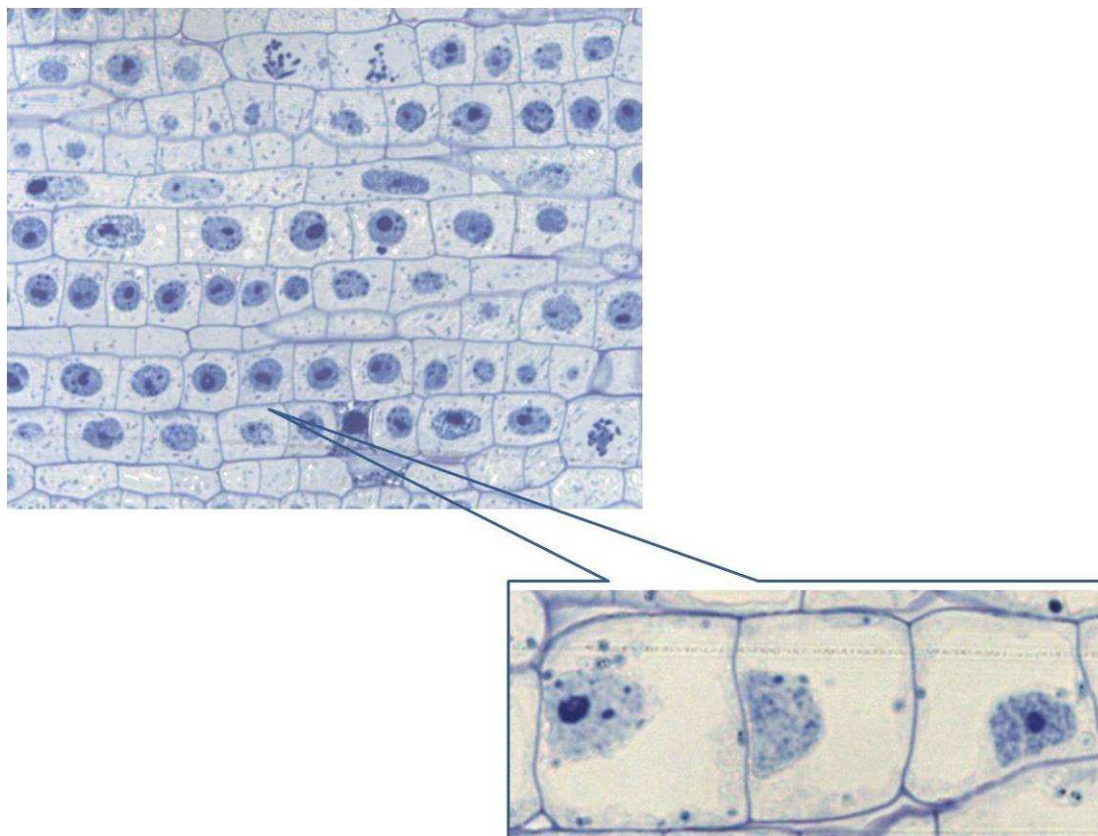


Figure 57 : Coupes de racines Témoin Hydroponie (grossissement x400 et x630).

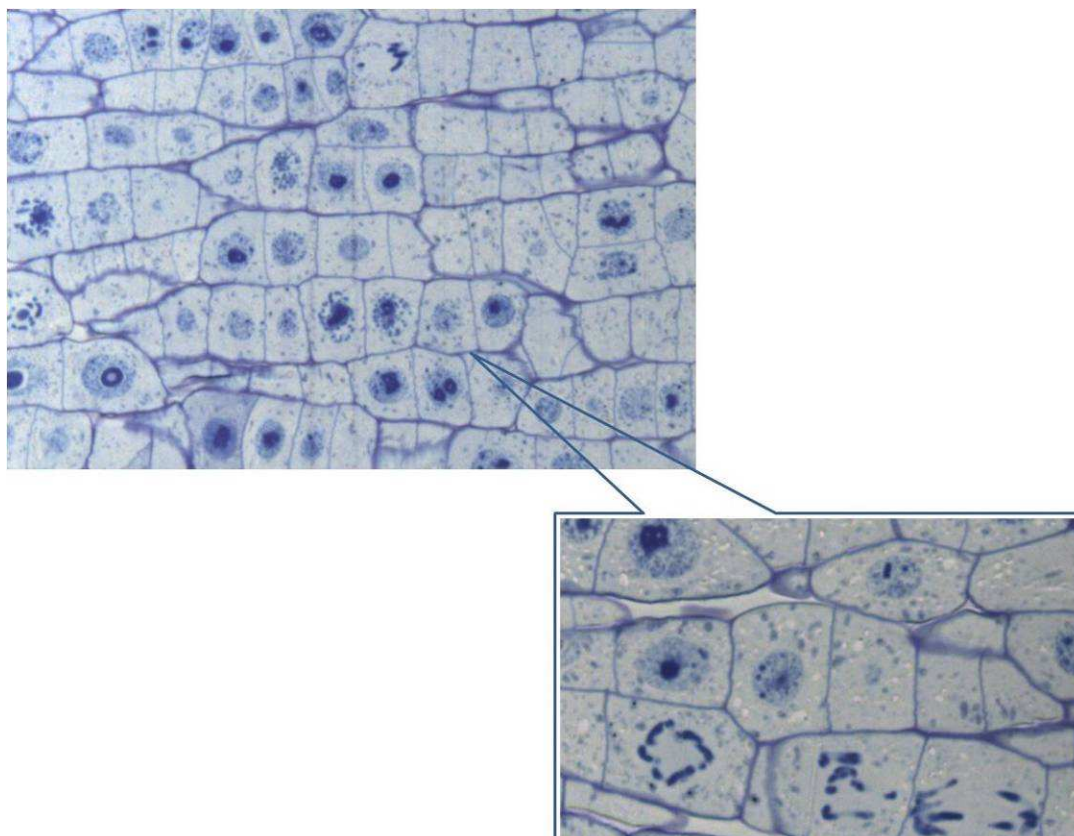


Figure 58 : Coupes de racines Plomb Hydroponie (grossissement x400 et x630).

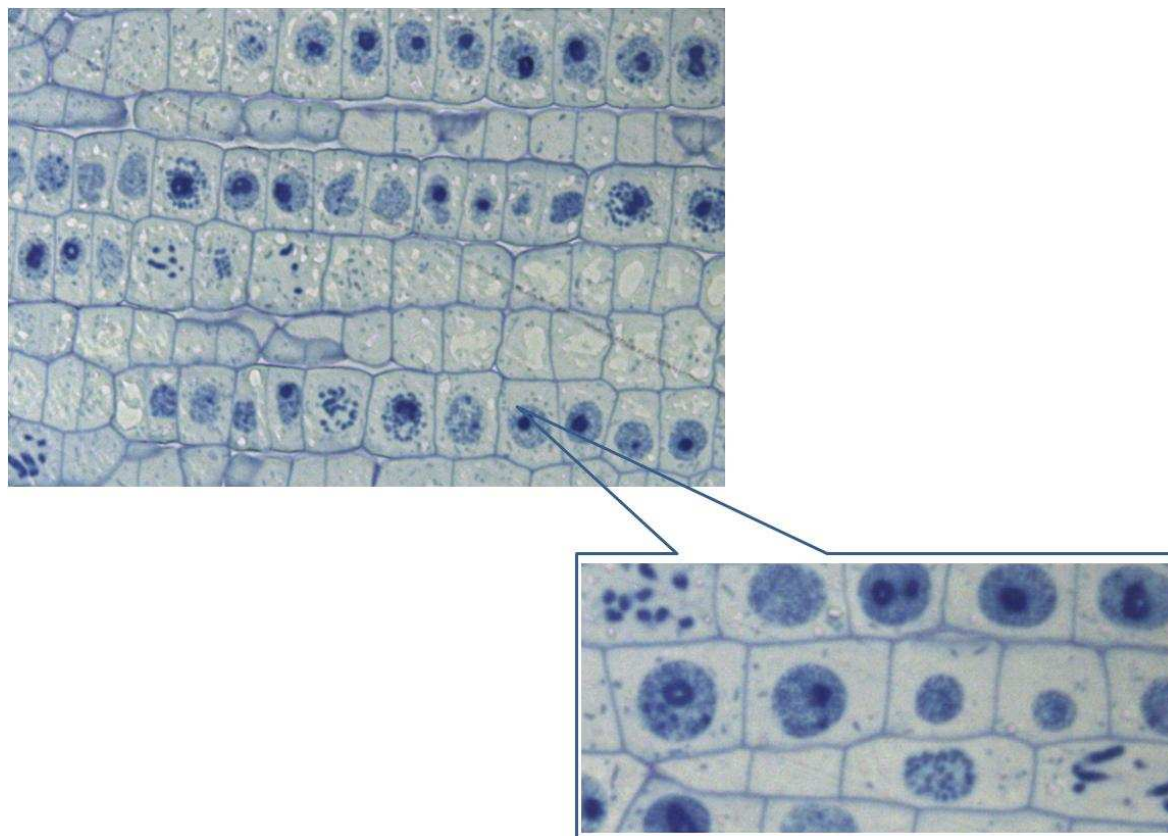


Figure 59 : Coupes de racines Témoin Sol (grossissement x400 et x630).

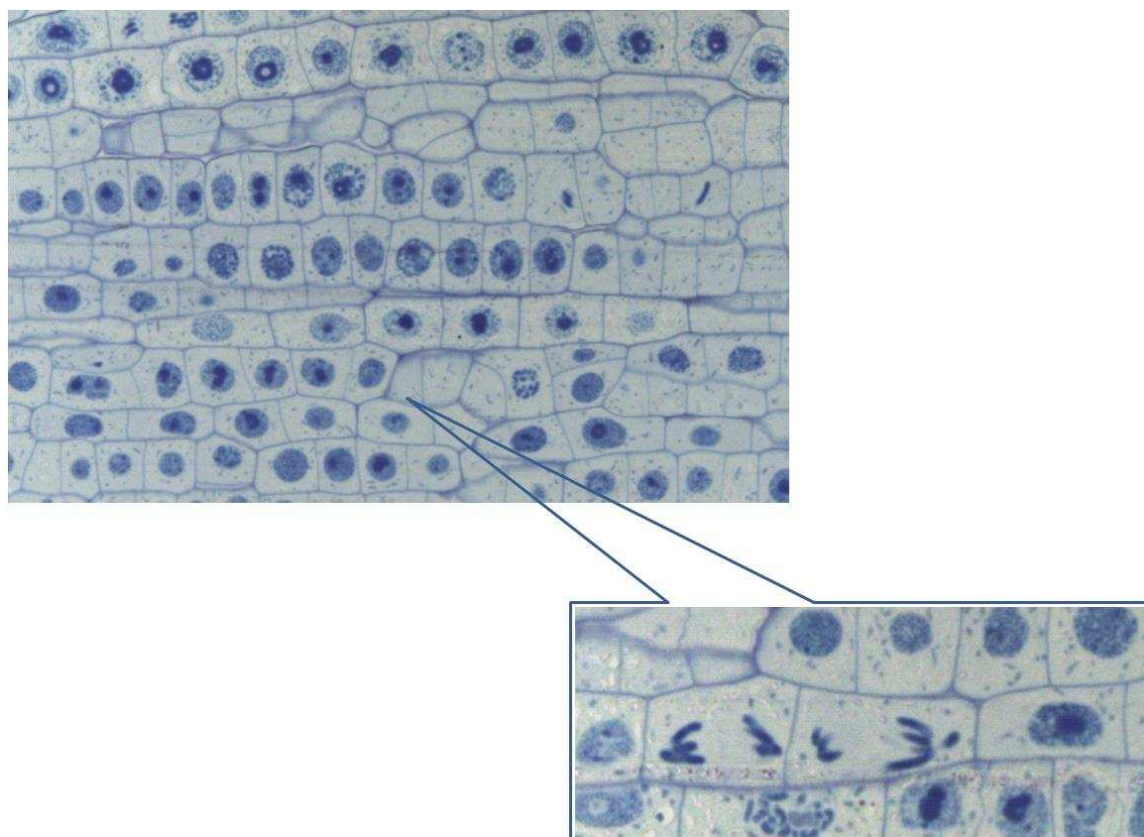


Figure 60 : Coupes de racines Plomb Sol (grossissement x400 et x630).

L'ensemble des observations réalisées montrent des racines en bon état de fonctionnement, avec des parois intègres, des noyaux en bon état, et des phases de divisions cellulaires nombreuses.

Le mode de culture n'aurait donc pas d'incidence majeure sur la structure des racines. Cependant, ces résultats sont à nuancer au vu du mode opératoire employé au cours de cette expérience. En effet, les plantes, avant d'être exposées soit au sol soit à la solution plombée, ont subi une phase de pré-culture en hydroponie. Cette phase de pré-culture a duré 4 jours et était destinée à exposer des plantes de même stade de développement aux 4 conditions de culture. La culture en hydroponie permettant une manipulation plus facile des plantes et leur transfert ensuite dans les différents bacs. Cependant, la pré-culture a pu introduire un biais dans les résultats, en effet les plantes se sont d'abord développées en hydroponie et il se peut que le temps d'exposition au sol n'ait pas été assez long pour que des différences de structure ne se mettent en place au niveau des racines.

4 Conclusion

Les résultats obtenus lors de ces travaux ont montré une génotoxicité du sol contaminé dans les deux conditions de culture. Cependant, l'amplitude de la réponse est beaucoup plus importante lors de l'exposition aux lixiviats, ce qui soulève la question du référentiel utilisé. Ces résultats indiquent qu'il semble judicieux de comparer uniquement des résultats obtenus par le même protocole et non les valeurs absolues des données obtenues après exposition en sol ou exposition en hydroponie.

Les résultats ont également mis en évidence que le transfert milieu extérieur-racines est équivalent pour les deux modes d'exposition, mais que la translocation est plus importante dans le cas d'une exposition directe au sol contaminé. Les teneurs en plomb total, mais également en plomb libre et labile dans la sève étaient également plus élevées dans le cas de la culture en sol. Ces teneurs en plomb labile sont bien corrélées aux teneurs en plomb total retrouvées dans les feuilles.

L'impact du plomb sur les plantes ne semble donc pas lié de façon simple à sa concentration totale dans les plantes, ni même à la capacité de la plante à transloquer le plomb vers les parties aériennes. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour essayer d'expliquer ces différences. Tout d'abord une différence dans la forme chimique du plomb au moment où il pénètre dans la plante, selon le mode d'exposition. De plus, en hydroponie, il y a une surface de contact entre le plomb et les racines qui est totale, les racines baignant librement dans la solution nutritive. Le plomb passe préférentiellement au niveau de l'apex (comme le calcium), pour éviter la barrière des bandes de Caspary (qui ne sont pas encore formées à ce niveau là). Ce flux rapide et brutal de plomb vers les racines entraînerait donc un stress oxydatif important qui provoquerait le noircissement de l'apex, et l'induction des micronoyaux. En sol par contre, la surface de contact entre le plomb et les racines est beaucoup plus faible. L'arrivée du plomb est donc moins soudaine au niveau de la plante. Le stress oxydatif généré serait alors moindre, entraînant une formation moins importante de micronoyaux. De plus, la possible présence d'acides organiques pourrait faciliter le passage du plomb dans la plante sous forme chélatée, et la translocation rapide vers les parties aériennes.

Nos résultats suggèrent donc une répartition des formes chimiques du plomb différente selon le mode d'exposition, qui pourraient être à l'origine des différences observées dans la toxicité et les transferts. Cependant, cette partie reste encore exploratoire, elle nous a permis d'établir des hypothèses de travail, mais des expériences supplémentaires restent à réaliser. Tout d'abord, la reproductibilité du test des micronoyaux en sol doit être validée par des essais supplémentaires. Un suivi du pH des sols et des solutions permettrait également de mieux comprendre le transfert du plomb. Ensuite, les dosages de plomb total dans la sève doivent être complétés. De nouvelles expériences seraient à mettre en place, avec des plantes plus âgées et taillées de façon à ne garder qu'un seul axe. Ceci permettrait d'obtenir une section de tige plus grande, et donc de plus grands volumes de sève. De plus, un dosage en chromatographie ionique serait plus approprié pour connaître la teneur en plomb libre dans la sève. De plus, les expériences de microscopies seraient également à renouveler, en évitant la phase de pré-culture en hydroponie, afin de pouvoir réellement comparer les morphologies des plantes se développant en sol de celles poussant en hydroponie.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse portaient donc sur l'étude d'un site industriel, en activité depuis 50 ans. Spécialisé dans la fonderie et l'affinage du plomb à partir de batteries usagées et de sous-produits de l'industrie du plomb, ce site est soumis à autorisation au titre de la législation sur les installations classées pour la protection de l'environnement. Après broyage des batteries, le plomb est fondu et réduit au four. Les charges des fours contiennent du plomb métallique en fût, des particules fines de filtration, des adjuvants de combustion (charbons), des adjuvants pour la réduction des oxydes et des sulfates qui génèrent des scories. Ensuite le plomb obtenu est affiné : le titre en plomb et autres éléments traces (Cu, Sb, Sn, As, Zn) est ajusté en fonction des commandes, puis le plomb est coulé en lingots et stocké avant expédition.

Il y a cinquante ans, la protection de l'environnement n'était pas une préoccupation majeure, mais elle est peu à peu devenue une question prépondérante. L'usine s'est donc équipée de nouvelles technologies et a mis en place plusieurs équipements pour répondre aux normes l'usine est certifiée ISO 14001 depuis septembre 1999 (norme relative à l'environnement), ISO 9001 (qualité) et OHSAS 18001 (relative à la santé et sécurité au travail) depuis janvier 2003. L'évolution la plus flagrante étant l'installation de filtres en sortie de cheminées, afin de diminuer considérablement les émissions et les retombées atmosphériques de l'usine. Cependant, des années d'activité de l'usine ont malgré tout entraîné une importante contamination des sols environnants. Les émissions diffuses de poussières fines représentent actuellement la source de pollution la plus importante.

Plusieurs questions étaient à la base de cette étude. Tout d'abord, quelle était l'étendue de la contamination par le plomb provoquée par les retombées atmosphériques de l'usine le long d'un profil de sol, ainsi qu'éventuellement en autres métaux impliqués dans l'activité de recyclage du plomb ? Ensuite, quels risques représentaient ce transfert du plomb du sol vers les végétaux ? Ceci pouvant avoir comme conséquence une contamination de la chaîne alimentaire. Et enfin quels étaient les impacts du plomb après absorption dans les plantes ?

Afin de répondre à ces questions, une démarche progressive a été utilisée tout le long de cette thèse. Après réalisation d'une fosse pédologique et d'un échantillonnage minutieux tous les 10 cm, les caractéristiques pédologiques de chaque échantillon ont été étudiées. Une mesure des concentrations pseudo-totales et totales en éléments majeurs et traces a permis d'évaluer la contamination du sol. Puis ces mesures ont été combinées avec des extractions chimiques séquentielles, afin d'estimer la profondeur de migration du plomb provenant de l'activité de l'usine, mais également d'identifier les phases porteuses principales du plomb ainsi que d'avoir une idée sur la quantité de plomb biodisponible dans ce sol. Cette approche pédologique globale a été complétée par la détermination des signatures isotopiques du plomb, des observations en MEB-EDS et des analyses en microsonde afin respectivement de vérifier l'origine du plomb présent le long du profil et d'acquérir des informations plus précises sur les formes chimiques du plomb dans le sol de surface le plus contaminé.

Il est possible d'utiliser en routine des extractions chimiques simples, comme au CaCl_2 pour estimer la phytodisponibilité des métaux. Cependant, le réactif chimique universel simulant

parfaitement l'absorption du métal quelle que soit sa nature, pour tous les métaux, tous les types de sol et toutes les espèces végétales n'a pas encore été trouvé (Baize, 2002). Pour apprécier la phytodisponibilité d'un métal, les végétaux restent donc les outils les plus pertinents. C'est pourquoi, des expériences de transfert sol-plante ont été réalisées en phytotron, en utilisant un dispositif de microculture, et deux types de plantes, des fèves et des tomates. Ce dispositif permet une récolte facilitée des différents organes des plantes, notamment les racines, qui sont plus difficiles à récolter en cas d'exposition directe avec le sol. De plus, cette technique permet de récupérer le sol après culture, considéré comme rhizosphérique, et permettant l'étude de l'impact des racines sur le sol. Plusieurs horizons de sol ont été testés, afin d'évaluer l'influence du plomb, mais également des caractéristiques pédologiques sur le transfert vers les plantes.

Enfin, les effets du plomb sur les plantes ont été évalués grâce au test des micronoyaux, en comparant deux modes de culture. L'hydroponie, qui est le mode de culture le plus largement utilisé dans les études de toxicité, et le contact direct avec le sol, qui se rapproche davantage des conditions environnementales naturelles. L'utilisation de ce test a été complétée par des dosages de plomb dans les plantes et dans la sève, ainsi que par des observations des racines en microscopie.

Comportement du plomb le long du profil de sol

Cette étude détaillée du plomb le long du profil de sol a permis de répondre à plusieurs questions, notamment concernant l'étendue de la contamination ainsi que la migration vers la profondeur. Les extractions à l'eau régale ont mis en évidence une forte contamination en plomb en surface, qui atteint près de 2000 mg.kg⁻¹. Ces concentrations diminuent rapidement avec la profondeur, mais restent supérieures à celles du fond géochimique jusqu'à 60 cm de profondeur, suggérant une migration du plomb provenant de l'activité de l'usine jusqu'à cette profondeur. Les extractions chimiques confirment ce changement de comportement du plomb à cette profondeur. Elles ont mis en évidence que les carbonates étaient la phase porteuse majeure du plomb dans les horizons contaminés (les 60 premiers cm), puis en dessous, le plomb est lié préférentiellement aux oxydes de fer. Cette forte affinité du plomb pour les oxydes de fer est bien connue et ces résultats suggèrent que dans les horizons contaminés, la quantité de plomb est plus importante que la capacité de fixation des oxydes de fer, c'est pourquoi il se fixe alors sur les carbonates, qui sont en grande quantité dans ce sol.

Cette contamination en surface est confirmée tout d'abord par les signatures isotopiques, qui en surface sont proches de celles retrouvées aux alentours d'une usine métallurgique (Véron et al., 1999). De plus, des facteurs d'enrichissement et des pourcentages de plomb anthropiques élevés sont cohérents avec ces observations. A partir de 60 cm, les rapports isotopiques augmentent, signe que l'on se rapproche du plomb endogène (Monna et al., 1997). Les facteurs d'enrichissement diminuent tout comme le pourcentage de plomb anthropique. L'ensemble de ces résultats confirment une différence significative dans le comportement du plomb entre la surface et la profondeur, et une influence beaucoup moins marquée de l'activité de l'usine (même si elle n'est pas complètement nulle) en dessous de 60 cm. Dans ce sol, des pH élevés supérieur à 7.5 en surface et une texture fine ont

limité la migration des métaux. Il n'en aurait sans doute pas été de même dans un contexte de sol acide ou très acide (tels que les sols forestiers).

Un autre résultat important apporté par les extractions séquentielles était la concentration en plomb élevée dans les fractions hydrosoluble et échangeable de l'horizon de surface traduisant une quantité importante de plomb potentiellement biodisponible et donc le risque d'une possible contamination de la chaîne alimentaire. A la suite de ces constatations, une étude des transferts de ce sol contaminé vers deux plantes potagères a été réalisée.

En plus du plomb, nous avons montré que l'activité de l'usine a généré une contamination en d'autres métaux. En effet, les concentrations en antimoine et étain sont très élevées en surface, accompagnées d'anomalies (moins marquées) en cuivre, zinc et arsenic. Cette contamination multi-métallique n'est pas surprenante, tous ces métaux (et métalloïde) faisant partie des sous-produits indésirables générés par le process de l'usine. Les extractions séquentielles ont montré que ces métaux étaient principalement liés aux oxydes de fer.

Les observations au MEB et à la microsonde ont surtout permis de visualiser les associations du plomb avec les oxydes de fer, ainsi que la présence des autres métaux. C'est pourquoi une analyse plus précise de la spéciation du plomb, ainsi que celle des autres métaux pourrait être réalisée, afin de déterminer les formes chimiques sous lesquelles se trouvent les métaux de façon plus précise. Des techniques telles que l'EXAFS ou la spectroscopie Raman pourraient être envisagées. En effet, l'EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) est une méthode d'analyse spectroscopique utilisant le rayonnement synchrotron (rayonnement électromagnétique émis par des électrons accélérés dans un anneau). Elle constitue une sonde de la structure locale autour de l'atome absorbeur étudié. La spectroscopie Raman est une méthode non-destructive permettant également de caractériser la composition moléculaire et la structure d'un matériau. La spectroscopie Raman est une technique de mesure locale : en focalisant le faisceau laser sur une petite partie du milieu, on peut sonder les propriétés de ce milieu sur un volume de quelques microns cube. On parle parfois de micro-Raman.

Evaluation du transfert sol/plante et modifications dans la rhizosphère

Les premiers résultats obtenus lors de l'analyse pédologique ont montré une fraction importante de plomb disponible, des expériences de culture ont donc été réalisées sur le sol contaminé afin d'affiner cette notion de phytodisponibilité.

La culture sur les différents horizons de sol n'entraîne pas d'effet phytotoxique après 8 jours de culture : les plantes ne présentent ni symptômes visibles de toxicité, ni pertes significatives de biomasse avec les plantes cultivées sur le sol témoin. Cependant, le transfert du plomb du sol vers les racines est important, les concentrations dans les racines atteignant les 1000 mg.kg^{-1} pour la tomate dans l'horizon le plus contaminé, une très grande partie de ce plomb étant adsorbé à la surface des racines (46 à 78%). Les résultats ont également montré que la majorité du plomb est séquestré dans les racines, la translocation vers les parties aériennes étant très limitée.

Ce dispositif de culture fournissait un accès aisé au sol rhizosphérique après la culture, ce qui a permis d'évaluer les actions racinaires au niveau de leur environnement proche. Une comparaison avec le sol avant culture a permis de montrer que la plante influait fortement sur le pH du sol. En effet, les racines provoquent une diminution d'une unité pH dans toutes les conditions d'analyses et quelque soit la plante. Ces variations de pH pourraient être expliquées soit par la respiration racinaire, qui entraîne un relargage de CO₂, soit par la source d'azote présente dans le sol, ou bien encore par une exsudation d'acides organiques par les racines. Il semble intéressant dans l'avenir de pouvoir caractériser de façon un peu plus fine ces effets provoqués par les racines. La connaissance des formes d'azote présentes dans le sol pourrait permettre de donner une première indication sur l'origine des variations de pH. De plus, il serait intéressant de prélever la solution du sol au voisinage des racines, à l'aide de rhizons (bougies poreuses) par exemple et d'essayer de caractériser les acides organiques potentiellement exsudés par les racines.

En plus de cette acidification significative, le plomb échangeable (somme des fractions hydrosoluble et échangeable) est considérablement augmenté dans la rhizosphère, suggérant une action significative de l'activité racinaire sur la biodisponibilité du plomb. En même temps, la fraction acido-soluble est celle qui diminue le plus au cours de la culture, conséquence finale de la diminution du pH dans le sol rhizosphérique, qui remet en solution le plomb des carbonates.

Contrairement à ce qui est très souvent reporté dans la littérature, nous avons donc démontré une mobilité certaine du plomb dans le sol étudié, traduite par un transfert vers les plantes important. Il pourrait être intéressant de travailler avec d'autres espèces végétales. En effet, même si nous n'avons pas observé de différences majeures entre la fève et la tomate, elles semblent malgré tout ne pas réagir tout à fait de la même manière à l'exposition à la contamination. Les fèves présentaient des facteurs de translocation plus élevés que les tomates, de plus, elles semblent absorber plus de plomb en condition de forte contamination. Ceci traduit une influence de l'espèce végétale sur le transfert du plomb. Il pourrait être intéressant notamment de travailler avec des espèces connues pour être accumulatrices de plomb. De plus, ces expériences réalisées sur des temps de cultures courts n'ont pas permis d'arriver jusqu'au stade fruit. Dans l'optique d'une évaluation des risques pour la santé humaine liés à la consommation de légumes cultivés en zones contaminées des cultures jusqu'aux fruits pourraient être réalisées. Même s'il est considéré comme faible dans la littérature, il serait judicieux d'évaluer le transfert éventuel du plomb vers les parties comestibles. Enfin, des cultures en plein champ aux alentours de l'usine pourraient être envisagées. Dans le cadre de l'évaluation de l'impact des sols contaminés sur les êtres vivants, il semble important de réaliser des tests in situ afin de prendre en compte l'ensemble des facteurs environnementaux.

Impact du plomb dans les plantes

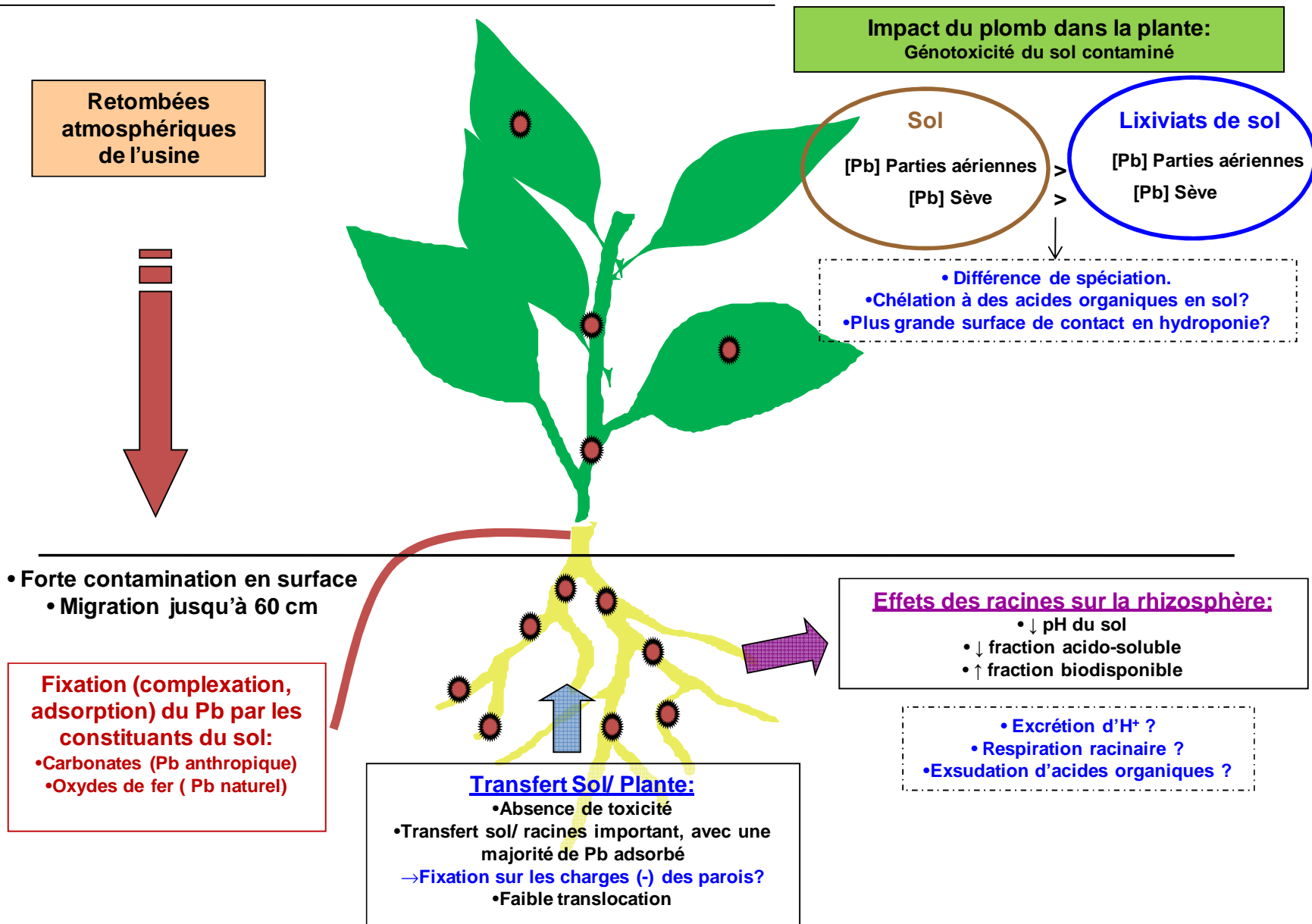
Les travaux constituant cette dernière partie sont plus exploratoires et restent à confirmer. Ils visaient à établir les effets que pouvaient provoquer le plomb une fois qu'il a pénétré dans les plantes. En effet, l'absence de symptômes visibles sur les plantes après une semaine de culture sur le sol contaminé malgré des concentrations en plomb élevées dans les racines soulève certaines

interrogations. D'autant plus que des travaux menés dans notre équipe ou rapportés dans la littérature font état d'effets visibles beaucoup plus rapides, mais ces travaux sont généralement menés en hydroponie, ce qui nous a conduit à comparer les deux modes de culture, sur des plants de *Vicia faba*. Le milieu liquide, le plus souvent utilisé dans les tests de toxicité et l'exposition directe au sol, plus proches des conditions naturelles.

L'utilisation du test des micronoyaux a permis de mettre en évidence un effet génotoxique du sol contaminé, dans les deux modes de culture. Cependant, bien que cohérent dans leurs conclusions, les résultats ont montré une grande différence dans l'amplitude de la réponse. L'utilisation de ce test après exposition directe au sol peut donc bien être envisagée pour des études de génotoxicité, bien qu'il ne bénéficie d'aucune norme. Il faut malgré tout être vigilant dans l'interprétation des résultats, et certains auteurs comme Song et al. (2006 et 2007) préconisent l'utilisation systématique des deux modes d'exposition.

Les plantes montrent par ailleurs un transfert du plomb équivalent vers les racines quel que soit le mode de culture, mais une translocation vers les parties aériennes nettement plus importante dans le cas de l'exposition directe au sol. Cette translocation plus importante était accompagnée d'une concentration en plomb total, ainsi qu'en plomb libre et labile plus élevée dans la sève. Les observations en microscopie n'ayant pas permis de mettre en évidence de modification de structure au niveau des racines, l'hypothèse majeure pouvant expliquer les différences entre le contact direct avec le sol ou avec les lixiviats serait une différence de spéciation. La forme sous laquelle est prélevé le plomb pourrait jouer sur la toxicité ainsi que sur la circulation du plomb dans la plante. Les plantes exposées aux lixiviats présentant une surface de contact plomb/ racine de 100% étant encore plus vulnérables. Par la suite, les dosages de plomb dans la sève doivent être confirmés, et l'utilisation de la chromatographie ionique semble la plus appropriée à la connaissance de la quantité de plomb libre dans la sève. Il serait également intéressant d'étudier la spéciation du plomb dans la sève et notamment de pouvoir caractériser les complexes éventuels plomb/chélates dans la sève. Une étude plus détaillée des mécanismes déclenchés par l'arrivée du plomb est nécessaire, tels que l'activation des systèmes de défense antioxydants, ainsi que la synthèse de phytochélatine par exemple. Il semble judicieux de réaliser ces mesures à des temps très courts afin d'essayer d'établir une cinétique de l'induction des effets provoqués par le plomb dès les stades très précoces d'exposition. Enfin des observations en microscopie en s'affranchissant de l'étape de pré-culture sont nécessaires afin de vérifier si l'absence de différence dans la structure des racines n'est pas due à cette phase commune de culture en hydroponie. Ces observations peuvent également être complétées par des observations dans d'autres organes, et l'utilisation d'un colorant permettant de localiser le plomb.

Globalement, une connaissance de l'acquisition racinaire ainsi que des mécanismes de résistance permettra de générer des plantes capables de coloniser des zones polluées, de détoxiquer certains sols par la phytoextraction ou d'éviter certaines pathologies.



Questions Scientifiques	Expériences	Résultats
Compartimentation et mobilité du plomb le long du profil du sol ?	Approche pédologique globale, complétée par des outils d'investigation complémentaires (HF, isotopie, MEB et microsonde)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Forte contamination en surface en Pb mais aussi en Sb et Sn, puis As, Cu et Zn dans une moindre mesure ➤ Migration du Pb, Sb et Sn jusqu'à 60 cm, et de As, Cu et Zn jusqu'à 40 cm ➤ Pb anthropique plutôt associé aux carbonates, et Pb naturels plutôt aux oxydes de fer, les autres métaux étant préférentiellement associés aux oxydes de fer tout le long du profil ➤ Fraction hydrosoluble + échangeable élevées (4.2 mg.kg⁻¹ Pb), traduisant un risque potentiel de passage dans la chaîne trophique
Etude des effets réciproques du sol et des plantes au cours d'une culture en fonction de la [Pb], des caractéristiques pédologiques et de l'espèce végétale	Expériences de cultures sur couche minces de sol contaminé : dosage du plomb dans les divers compartiments des plantes, et comparaison du sol avant et après culture	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aucune phytotoxicité observée ➤ Transfert du plomb vers les racines important, avec entre 50 et 80% du plomb des racines adsorbé à la surface <ul style="list-style-type: none"> ➤ Faible translocation vers les feuilles ➤ Acidification importante du sol par les racines ➤ Augmentation de la fraction biodisponible, accompagnée d'une diminution de la fraction liée aux carbonates
Impact du plomb dans la plante ? (comparaison de deux modes de culture)	Test des micronoyaux, transfert sol/ plante, dosage du plomb dans la sève et analyses microscopiques des tissus	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Génotoxicité avérée du sol industriel ➤ Différence importante dans l'amplitude de la réponse, le test par lixiviats générant beaucoup plus de micronoyaux en valeur absolue ➤ Transfert équivalent du plomb vers les racines selon le mode de culture, mais translocation plus importante en contact direct avec le sol, accompagnée d'une [Pb] plus importante dans la sève et dans les feuilles <ul style="list-style-type: none"> ➤ Aucune différence observée dans la morphologie des racines

Tableau 22 : Récapitulatif des différentes questions à l'origine de ces travaux ainsi que des réponses apportées et des hypothèses proposées.

Ce travail apporte donc un certain nombre d'éléments pour la compréhension du devenir du plomb dans le sol et le risque associé pour les organismes vivants (Tableau 22). Par cette meilleure connaissance des mécanismes, les entreprises peuvent ainsi envisager une gestion des risques plus pertinente pour leurs sites et sols pollués. Cependant, comme le transfert sol-plante est complexe car influencé par de très nombreux facteurs en interaction (liés à la fois aux caractéristiques du sol, de la plante et du polluant), de nombreuses perspectives découlent de ces recherches.

Références bibliographiques

- Alloway B.J.**, 1995. Heavy metals in soils. Blackie Academic & Professional, London, 2nd Edition, 368 p.
- AFNOR**, 1999. Qualité des sols. Recueil de normes. Volume 1, 566p.
- Ames B., Dusrton E., Yamasaki E., Lee F.**, 1973. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection. Proceedings of the National Academy of Sciences, 70, 2281-2285.
- Andrews S., Sutherland R.A.**, 2004. Cu, Pb and Zn contamination in Nuuanu watershed, Oahu, Hawaiï. The Science of the Total Environment 324: 173-182.
- Antosiewicz D.M.**, 2005. Study of calcium-dependant lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. Environmental Pollution 134: 23-34.
- AGHTM**, 1996. Aspects analytiques du plomb dans l'environnement. Techniques et documentation Ed, 483 p.
- Bacon, J.R., Farmer, J.G., Dunn, S.M., Graham, M.C., Vinogradoff, S.I.**, 2006. Sequential extraction combined with isotope analysis as a tool for the investigation of lead mobilisation in soils: Application to organic-rich soils in an upland catchment in Scotland. Environmental Pollution, 141:469-481.
- Badawy S.H., Helal M.D., Chaudri A.M., Lawlor K., McGrath S.P.**, 2002. Soil solid-phase controls lead activity in soil solution. J. Environ. Qual., 31, 162-167.
- Baes C.F., Mesmer R.E.**, 1976. The hydrolisis of cations. John Wiley and Sons, New York.
- Baron M.**, 2001. Suppression de l'utilisation de la grenaille de plomb de chasse dans les zones humides exposant les oiseaux d'eau au saturnisme. Rapport MEDD, 20p.
- Baize D.**, 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. INRA Éditions, Paris. 410 pp.
- Baize, D.**, 2002. Les éléments traces métalliques dans les sols. INRA éditions.
- Baker A.**, 1981. Accumulators and excluders. Strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3: 643-654.
- Battaglia A., Calace N., Nardi E., Petronio B.M., Pietroletti M.**, 2007. Reduction of Pb and Zn bioavailable forms in metal polluted soils due to paper mill sludge addition. Effects on Pb and Zn transferability to barley. Bioresource technology 98: 2993-2999.
- Bekaert R.**, 1999. Impacts écotoxicologiques de sols pollués et de déchets sur le compartiment aquatique : mesure de la toxicité subchronique de trois marqueurs (EROD, adduits et micronoyaux) chez les larves de *Xenopus laevis*. Thèse, UPS, 119p.
- Bhowmik, N., Sharma, A.**, 1999. Effect of inorganic lead on growth and development of *Hordeum vulgare* L. In: Wenzel, W.W., Adriano, D.C., Alloway, B., Doner, H.E., Keller, C., Lepp, N.W., Mench, M., Naidu, R., Pierzynski, G.M. (Eds.), Proceedings of the Fifth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, vol. 2 Technical University, Vienna, Austria, 11–15 July 1999, International Society for Trace Element Research, Vienna, pp. 1144–1145.
- Bittel J.R., Miller R.J.**, 1974. Lead, Cadmium, and Calcium selectivity coefficients on Montmorillonite, Illite and Kaolinite. Journal of Environmental Quality, 3: 250-253.
- Bourg A.C.M.**, 1988. Metal in aquatic and terrestrial systems : sorption, speciation and mobilisation. In Chemistry and biology of solid waste, Salmons W., Forstner U., U. Eds., New-York: Springer Verlag, 3-30.
- Bourrelie PH., Berthelin J.**, 1998. Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. Académie des sciences, Technique et documentation, Rapport n°42, Lavoisier, 440p.
- BRGM**, 2004. Guide méthodologique du plomb appliqué à la gestion des sites et des sols pollués. Rapport final, BRGM/RP-52881-FR.
- Briat J.F., Lebrun M.**, 1999. Plant responses to metal toxicity. Plant Biology and Pathology, Académie des Sciences, Elsevier, Paris, 322: 43-54.

- Brun LA., Maillet J., Richarte J., Herrmann P., Remy JC.,** 1998. Relationship between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution* 102: 151-161.
- Buatier M., Sobanska S., Elsass F.,** 2001. TEM-EDS investigation on Zn and Pb contaminated soils. *Applied Geochemistry* 16 (9-10): 1165-1177.
- Bur T.,** 2005. Distribution et origines du plomb dans les roches mères molassiques et les sédiments de petit cours d'eau drainant des bassins versants sous cultures et sous forêts en région Midi-Pyrénées. Rapport de DAA de l'ENSAT, 50 p.
- Burzynski M.,** 1987. The influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 9: 229-238.
- Canut A., Bur T., Grialou M., Jolivet C., Revel J.C., Probst J.L. et Guisresse M.** 2007. Qualité des sols en Midi-Pyrénées. Premiers résultats du RMQS (Réseau de Mesures de la Qualité des Sols). Poster proposé aux journées de l'AFES avril 2007 INH Angers.
- Carpita NC., Gibeaut DM.,** 1993. Structural models of primary-cell walls in flowering plants - consistency of molecular-structure with the physical-properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3 (1): 1-30.
- Cecchi M., Dumat C., Alric A., Felix-Faure B., Pradère P., Guisresse M.,** 2008. Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma*, in press.
- Chaignon V., Hinsinger P.,** 2003. A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated Soil. *Journal of Environmental Quality* 32: 824-833.
- Chandra S., Chauhan LKS., Pande PN., Gupta SK.,** 2004. Cytogenetic effects of leachates from tannery solid waste on the somatic cells of *Vicia faba*. *Environmental toxicology* 19(2): 129-133.
- Chatterjee A., Banerjee RN.,** 1999. Determination of lead and other metals in a residential area of greater Calcutta. *The Science of the Total Environment* 227 (2-3): 175-185.
- Chatterjee J., Chatterjee C.,** 2003. Management of phytotoxicity of cobalt in tomato by chemical measures. *Plant Science* 64 (5): 793-801.
- Chenon P.,** 2001. Evaluation du pouvoir toxique, génotoxique et tératogène de boues de stations d'épuration. Thèse, UPS 204p.
- Chuang MC., Shu GY., Liu JC.,** 1996. Solubility of heavy metal in a contaminated soil: effects of redox potential and pH. *Water, Air and Soil Pollution* 34: 543-556.
- Chumbley CG., Unwin RJ.,** 2004. Cadmium and lead content of vegetables crops grown on land with an history of sewage sludge application. *Environmental Pollution (Series B)* 4: 231-237.
- Clemens S., Antosiewicz DM., Ward JM., Schachtman PD., Schroeder JI.,** 1998. The plant cDNA LCT1 mediate the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 12043-12048.
- Cornu, S., Deschatrettes, V., Salvador-Blanes, S., Clozel, B., Hardy, M., Branchut, S., Le Forestier, L.,** 2005. Trace element accumulation in Mn-Fe-oxide nodules of a planosolic horizon. *Geoderma*, 125: 211-224.
- Cotelle S., Masfaraud J.F., Féraud J.F.,** 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the Allium/Vicia-micronucleus and the Tradescantia-micronucleus assays. *Mutation Research*, 426, 167-171.
- Cotelle S., Féraud J.F.,** 2001. Effets génotoxiques sur végétaux supérieurs: évaluation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les racines secondaires de *Vicia faba*. Projet de norme-ESSBE Université de Metz, France.
- Cotter-Howells J., Champness PE., Charnock JM.,** 1999. Mineralogy of Pb-P grains in the roots of *Agrotis capillaries* L. by ATEM and EXAFS. *Mineralogical Magazine* 63: 777-789.
- Cui YL., Zhu YG., Zhai RH., Chen DY., Huang YZ., Qui Y.,** 2004. Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Nanning, China. *Environmental Pollution* 2: 181-188.

Cui S., Zhou QX., Wei SH., Zhang W., Cao L., Ren LP., 2007. Effects of exogenous chelators on phytoavailability and toxicity of Pb in *Zinnia elegans* Jacq. Journal of Hazardous Materials 146: 341-346.

Cunningham SD., Berti WR., 1993. Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. In Vitro Cellular and Developmental Biology. 29:207-12

Darrah PR., 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. Plant and Soil 155: 1-20.

Das AK., Chakraborty R., Cervera ML., DeLaGuardia M., 1995. Metal speciation in solid matrices. Talanta 42: 1007-1030.

Del Rio-Celestino M., Font R., Moreno-Rojas R., De Haro-Bailon A., 2006. Uptake of lead and zinc by wild plants growing on contaminated soils. Industrial Crops and products 24 (3): 230-237.

DeMatos AT., Fontes MP., DaCosta LM., Martinez MA., 2001. Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils. Environmental Pollution 111 (3): 429-435.

Ding AF., Pan GX., 2003. Contents of heavy metals in soils and Chinese cabbages from some urban vegetables fields around Nanjing and Human Health risks. Ecological Environment 12(4): 409-411.

Diyab C., 2005. Influence des plantes (Pois et Tomate) et des amendements phosphates (solide ou soluble) sur la spéciation et la phytodisponibilité des métaux (Pb et Zn) dans un sol contaminé par les retombées atmosphériques d'une usine pyrométallurgique. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 271p.

Do Nascimento CWA., Xing B., 2006. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. Scientia Agricola 63 (3): 299-311.

Doucet S., Morel JL., Wiart J., 1999. Influence du chaulage sur la biodisponibilité des éléments métalliques en trace incorporés au sol lors de l'épandage de boues. Etudes et Gestion des Sols 6 (2) : 105-114.

Dumat C., Chiquet A., Goody D., Aubry E., Morin G., Juillot F., Benedetti M., 2001. Metal ion geochemistry in smelter impacted soils and soil solutions. Bulletin de la Société Géologique de France 172: 539-548.

Dumat C. 2003. "Le Plomb". Synthèse bibliographique, 20 pages. Les métaux et leur impact environnemental, journée Plomb de l'APESA. 25 septembre 2003, Pau.

Dumat C., Quenea K., Bermond A., Toinen S., Benedetti M.F., 2006. A study of the trace metal ion influence on the turn-over of soil organic matter in various cultivated contaminated soils. Environmental Pollution, 142: 521-529.

Dumat C., 2006. Transfert des éléments traces métalliques dans le système sol-plante. Influence de la spéciation. HDR de l'INPT 68e section

El Hajjouji H., Pinelli E., Guisresse M., Merlina G., Revel JC., Hafidi M., 2007. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. Mutation Research 634: 25-31.

Ernst WHO., 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. Applied Geochemistry 11: 163-167.

Ettler V., Mihaljevič M., Komárek M., 2004. ICP-MS measurements of lead isotopic ratios in soils heavily contaminated by lead smelting: tracing the sources of pollution. Analytical and Bioanalytical Chemistry 378: 311-317.

Ettler V., Vanek A., Mihaljevic M., Bezduška P., 2005. Contrasting lead speciation in forest and tilled soils heavily polluted by lead metallurgy. Chemosphere, 58: 1449-1459.

EUROPE SOL, 1999. Investigation légère du terrain à l'intérieur de l'usine B1 de la société de traitement chimique des métaux (STCM) sur le site de Bazoches-les-Gallérandes (45).

Evangelou MWH., Ebel M., Schaeffer A., 2007. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 68: 989-1003.

Evans LJ., 1989. Chemistry of metal retention by soils. *Environmental Science and technology* 23: 1046-1056.

Fan TW., Lane AN., Pedler J., Crowley D., Higashi M., 1997. Comprehensive analysis of organic legends in whole roots exudats using nuclear magnetic resonance and gas chromatography mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 251: 57-68.

Feng S., Wang X., Wei G., Peng P., Yang Y., Cao Z., 2007. Leachates of municipal solid waste incineration bottom ash from Macao: Heavy metal concentrations and genotoxicity. *Chemosphere* 67: 1133-1137.

Ferrand E., 2005. Spéciation et transfert sol-plante du zirconium : détermination des facteurs prépondérants et étude des mécanismes physico-chimiques mis en jeu. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

Ferrand E., Dumat C., Leclerc-Cessac E., Benedetti M., 2006. Phytoavailability of zirconium in relation to its initial added form and soil characteristics. *Plant Soil* 2006; 287: 313-325.

Fleischer M., 1966. Index of new mineral names, discredited minerals and changes of mineralogical nomenclature in volumes 1-50 of the American Mineralogist, *American Mineralogist* 51 (8): 1247-1357.

Fodor F., Sarvari E., Lang FR., Szigeti Z., Cseh E., 1996. Effects of Pb and Cd on cucumber depending on the Fe-complex in the culture solution. *Journal of Plant Physiology* 148: 434-439.

Fytianos K., Katsianis G., Triantafyllou P., Zachariadis G., 2001. Accumulation of heavy metal in vegetables grown in an industrial area in relation to soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 423-430.

Gavalda, D., 2001. Devenir des éléments traces métalliques dans les brouillards (livi-redoxisol) après épandage de boues granulees. Thèse de doctorat, INP-ENSAT, 258p.

Gavalda D., Scheiner J.D., Revel J.C., Merlina G., Kaemmerer M., Pinelli E, Guiesse M., 2005. Agronomic and environmental impacts of a single application of heat-dried sludge on a Alfisol. *The Science of the Total Environment*, 343, 97-109.

Gerritse RG., Vriesema R., Dalenberg JW., De Roos HP., 1982. Effects of sewage sludge on trace element mobility in soils. *Journal of Environmental Quality* 11: 359-364.

Gisbert C., Ros R., De Haro A., Walker DJ., Bernal MP., Serrano R., Navarro-Aviño J., 2003. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research communication* 303: 440-445.

Gobat J. M., Aragno M. et Matthey W., 1998. Le sol vivant. Bases de pédologie, biologie des sols, Presses polytechniques et universitaires romandes, vol 14, coll. gérer l'environnement, 592pp.

Grill E., Winnacker EL., Zenk MN., 1987. Phytochelatins, a class of heavy metals binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings - National Academy Of Sciences USA* : 84 : 439-443.

Gu SH., Zhu JZ., Gu ZL., 1989. Study on the critical lead content of red paddy soil. *Agro-environmental Protection* 8: 17-22.

Guivarch A., Hinsinger P. AND Staunton S., 1999. Root uptake and distribution of radiocesium from contaminated soil and the enhancement of Cs adsorption in the rhizosphere. *Plant and soil*, 211: 131-138.

Gupta SK., Vollmer MK., Krebs R., 1996. The importance of mobile, mobilisable and pseudo-total heavy metal fraction in soil for three-level risk assessment and risk management. *The Science of the Total Environment*.

Halim M., Conte P., Piccolo A., 2003. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere* 52: 265-275.

Hammer D., Keller C., 2002. Changes in the rhizosphere of metal-accumulating plants evidenced by chemical extractants. *Journal of Environmental Quality*, 31:1562-1569.

Hammett FS., 1929. Studies in the biology of metals: the influence of lead on mitosis and cell size in the growing root. *Protoplasma* 5: 535-542.

Hamon RE., McLaughlin MJ., Gilkes RJ., Rate AW., Zarcinas B., Robertson A., Cozens G., Radford N., Bettenay L., 2004. Geochemical indices allow estimation of heavy metal background concentrations in soils. *Global Biogeochemical Cycles*, 18:1014.

Harter RD., Naidu R., 1995. Role of metal-organic complexation in metal sorption by soils. *Advances in Agronomy* 55: 219-261.

Hatira A., Gallali T., Rouillet J., Guillet B., 1990. Stabilité et solubilité des complexes formés entre le cuivre, le plomb, le zinc et les acides fulviques. *Science du Sol* 28 : 123-135.

Hem JD., 1985. Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water. US Geological Survey Water Supply Paper 2254, US Geological Survey, Alexandria Virginia.

Hernandez L., 2003. Dynamique des éléments trace métalliques dans les sols de différents écosystèmes forestiers français. Origine, distribution physique et chimique et facteurs de contrôle. Thèse de doctorat de l'université Toulouse III, 266 p.

Hernandez L., Probst A., Probst JL., Ulrich E., 2003. Heavy metal distribution in some forest soils: evidence for atmospheric contamination. *The science of the total environment* 312: 195-219.

Hettiarachchi, G. M. & Pierzynski, G.M., 2002. In situ stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide: influence of plant growth. *Journal of Environmental Quality*, 31, 564-572.

Hinsinger P., Gilkes RJ., 1996. Mobilisation of phosphates rock and alumina-sorbed phosphate by roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. *European Journal of Soil Science*. 47: 53-544.

Hinsinger P., 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 24: 225-265.

Hinsinger P., 2001. Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In *Trace Elements in the Rhizosphere* (G.R. Gobran, W.W. Wenzel and Lombi Eds.), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA, pp 25-41.

Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B., 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints – a review. *Plant and Soil*, 248, 43-59.

Hinsinger P., Schneider A., Dufey J.E., 2005. Le sol : ressource en nutriments et biodisponibilité. In « *Sols et Environnement* », Dunod (ed), Paris, 285-305.

Ho, M.D., Evans, G.D., 2000. Sequential extraction of metal contaminated soil with radiochemical assessment of readsorption effects. *Environmental Science and Technology*, 34: 1030-1035.

Huang JW., Cunningham SD., 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* 134: 75-84.

Huang JW., Chen JJ., Berti WR., Cunningham SD., 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology* 31: 800-805.

Ildefonse P., Juillot F., Morin G., Calas G., Buatier M., Benedetti M., Chevallier P., Populus P., Brown G., Trainor T., Osterggren J., 1999. Approche intégrée de la spéciation des métaux dans les sols. Club CRIN Environnement. Spéciation des métaux. Les cahiers des clubs CRIN. CRIN Eds et le ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement : 179-213.

INERIS, 2006. Synthèse des valeurs réglementaires pour les substances chimiques en vigueur dans l'eau, l'air et les denrées alimentaires en France au 1^{er} mars 2006. Rapport d'étude 06/2006. N°INERIS-DRC-06-75999/DESP-R2a.

- Jain K., Singh J., Chauban LKS., Murthy RC., Gupta SK.,** 2004. Modulation of flyash-induced genotoxicity in *Vicia faba* by vermicomposting. *Ecotoxicology and Environment Safety* 59: 89-94.
- Jaylet A., Deparis P., Gaschignard D.,** 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of axolotl larvae following in vivo exposure to mutagenic agents. *Mutagenesis*, 1 (3), 211-215.
- Jin CW., Zheng SJ., He YF., Zhou GD., Zhou ZX.,** 2005. Lead contamination in tea garden soils and factors affecting its bioavailability. *Chemosphere*, 59: 1151-1159.
- Jones DL., Darrah PR.,** 1995. Influx and efflux of oraganic acids across the root-soil interface of *Zea mays* L., and its implication in rhizosphere C flow. *Plant and Soil* 173: 103-109.
- Jones DL.,** 1998. Organic acids in the rhizosphere. A critical review. *Plant and Soil* 205 : 25-44.
- Juillot F.,** 1998. Localisation et spéciation de l'arsenic, du plomb, du zinc dans les sols contaminés, comparaison avec un sol développé sur une anomalie géochimique naturelle en plomb. Thèse université de Paris 7, 227 p.
- Juste C.,** 1988. Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. *Sci. Sol* 26 (2) 103-112.
- Kabata-Pendias A., Pendias H.,** 1992. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2nd Edition, 209 p.
- Karataglis SS.,** 1981. Influence of the soil Ca on the tolerance of *Festuca rubra* population against toxic metals. *Phyton* 21: 103-113.
- Kersten M., Moor HC., Johnson CA.,** 1997. Speciation of trace element in leachate from a MSWI bottom ash landfill. *Applied geochemistry* 12 (5): 675-683.
- Kim IS., Kang HK., Johnson-Green P., LEE EJ.,** 2003. Investigation of heavy metal accumulation in *Polygonum thunbergii* for phytoextraction. *Environmental Pollution* 126: 235-243.
- Kinniburgh., Milne CJ., Benedetti MF., Pinheiro JP., Filius J., Koopal LK., Van Riemsdijk WH.,** 1996. Metal ion binding by humic acid: application of the NICA-Donnan Model. *Environmental Science and Technology* 30: 1687-1698.
- Knasmuller S., Gottman E., Steinkellner H., Fomin A., Pickl C., Paschke A, God R, Kundi M.,** 1998. Detection of genotoxic effect of heavy metal with plant bioassay. *Mutation Research* 493 : 87-93.
- Kochian LV.,** 1993. Zinc absorption from hydroponic solution by plants roots. In: Robson AD. Ed, Zinc in soil and plants. Dordrecht, The Netherland: Kluwer Academic publisher 45-57.
- Komarek M, Chrastny V, Stichova J.,** 2007. Metal/metalloid contamination and isotopic composition of lead in edible mushrooms and forest soils originating from a smelting area. *Environment International* 33: 677-684.
- Komarek M., Ettler V., Chrastny V. Mihaljevic M.,** 2007. Lead isotopes in environmental sciences: a review. *Environmental International*, in press.
- Kopittke PM., Colin JA., Kopittke RA., Menzies NW.,** 2007. Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental Pollution*, in press.
- Kot A., Namiesnik J.,** 2000. The role of speciation in analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 19: 69-79.
- Kupper H., Kupper F., Spiller M.,** 1996. Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany* 47: 259-266.
- Lagadic L., Caquet Y., Amiard J.C., Ramade F.,** 1997. Biomarqueurs en ecotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson (ed), Paris, France, 419 p.
- Lamand M.,** 1991. Les oligo-éléments dans la biosphère. Dans Les oligo-éléments en médecine (Ed), et en biologie, Chappuis P, SFERETE, Lavoisier Tec&Doc, Paris, 25-39.

Lamy I., 2002. Réactivité des matières organique des sols vis-à-vis des métaux. Journées nationales de l'étude des sols. 22-24 octobre, Orléans.

Lamy, I., Van Oort, F., Dere, C., Baize, D., 2006. Use of major – and trace - element correlations to assess metal migration in a sandy Luvisol irrigated with waste water. *European Journal of Soil Science*, 57: 731-740.

Lasat MM., 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 39: 109-120.

Lee PK., Touray JC., 1998. Characteristics of a polluted artificial soil located along a motorway and effects of acidification on the leaching behavior of heavy metals (Pb, Zn, Cd). *Water Research* 32 (11): 3425-3435.

Leguedois S., Van Oort F., Jongmans T., Chevalier P., 2004. Morphology, chemistry and distribution of neoformed spherulites in agricultural land affected by metallurgical point-source pollution. *Environmental Pollution* 130: 135-148.

Leleyter L., 1998. Spéciation chimique des éléments majeurs, traces et des terres rares dans les matières en suspension et dans les sédiments de fond des cours d'eau : application aux fleuves de Patagonie (Argentine), à la Piracicaba (Brésil), à l'Oued Sebou (Maroc) et à l'Ille (France). Thèse de doctorat, université Louis Pasteur, Strasbourg, 297 p.

Leleyter L. and Probst J.L., 1998. A new sequential extraction for the speciation of particulate trace elements in river sediments. *Intern. J. Environ. Anal. Chem* 73(2): 109-128.

Leopold I., Gunther D., Schmidt J., Neumann D., 1999. Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 50: 1323-1328.

Lestan D., Luo CL., Li XD., 2007. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils : a review. *Environmental Pollution*, in press.

Li LY., Li RS., 2000. The role of clay minerals and the effects of H⁺ ions on removal of Heavy metals (Pb²⁺) from contaminated soils. *Canadian Journal of Geotechnique* 37 (2): 296-307.

Li JX., Yang XE, He ZL., Jilani G., Sun CY., Chen SM., 2007. Fractionation of lead in paddy soils and its bioavailability to rice plants. *Geoderma*, 141: 174-180.

Liator I., 1988. Review of soil solution samplers. *Water Resources Research* 24: 727-733.

Lichtenberger O., Neumann D., 1997. Analytical electron microscopy as a powerful tool in plant cell biology: examples using electron energy loss spectroscopy and X-ray microanalysis. *European Journal of Cell Biology* 73 (4): 378-386.

Lin Q., Chen YX., He YF., Tian GM., 2004. Root-induced changes of lead availability in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 104: 605-613.

Liu P., Huang M., 2003. Kinetic of lead adsorption by iron oxides formed under the influence of citrate. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 67: 1045-1054.

Liu J., Li K., Xu J., Zhang Z., Ma T., Lu X., Yang J., Zhu Q., 2003. Lead toxicity, uptake, and translocation in different rice cultivars. *Plant Science* 165: 793-802.

Loudes J.P., 2002. Mise au point de biotests sur les plantes pour mettre en évidence un effet toxique ou agronomique de substances exogènes (Zinc, Plomb, Substances Humiques). Stage DEA.

Loe A., 1993. Oligoelements en agriculture. Editions Nathan, 577 p.

Ma TH., Xu Z., Xu C., McConnell H., Rabago EV., Arreola GA., Zhang H., 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research* 334: 185-195.

MacLaughlin M.J., Smolders E., Merckx R., 1998. Soil-root interface: physicochemical processes. In *Soil Chemistry and Ecosystem Health*. Special publication n°52 pp233-277. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.

MacLaughlin MJ., Zarcinas BA., Stevens BA., Cook N., 2000. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31:1661-1700.

Malkowski EK., Galas W., Karez W., Kuperberg JM., 2002. Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effects on growth and the concentration of potassium and calcium. *Plant Growth Regulation* 37: 69-76.

Manceau A., Charlet L., Boisset MC, Didier B., Spadini L., 1992. Sorption and speciation of heavy metals on hydrous Fe and Mn oxides. From microscopic to macroscopic. *Applied Clay Science* 7: 201-223.

Marcato CE., 2007. Origine , devenir et impact du cuivre et du zinc des lisiers porcins. Rôle de la digestion anaérobie. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 183p.

Marschner H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Presse, London, 2nd Edition, 889 p.

Marschner H., Romheld V., 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil* 165: 261-274.

Martinez CE., Motto HL., 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution* 107: 153-158.

Mattina MJL., Lannucci-Berger W., Musante C., White JC., 2003. Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soils. *Environmental pollution*, 124: 375-378.

Menke M., Angelis KJ., Schubert I., 2000. Detection of specific DNA lesion by a combination of Comet Assay and FISH in plants. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35 : 132-138.

Mench M., 1990. Transfert des oligo-éléments du sol à la racine et absorption. *Compte-rendu de l'Académie de l'Agriculture Française* 76 : 17-30.

Mench M., Morel JL., Guckert A., Guillet B., 1988. Metal binding with roots exudates of low molecular weight. *Journal of Soil Science* 39: 521-527.

Mikac N., Branica M., Harrison RM., 2001. Total and organic lead distribution in water, sediments and organisms from the Eastern Adriatic Coast. *Chemical Speciation and Bioavailability* 13 (4): 121-128.

Miquel MG., 2001. Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé, rapport de l'office parlementaire des choix scientifiques (Sénat).

Missini S., Lombi E., 1997. Heavy metal contents and mutagenic activity evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Research* 393: 17-21.

Missini S., Caccese D., Passafiume F., Grella A., Ciccotti E., Rizzoni M., 1998. Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals contents of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Roma. *Mutation Research* 420: 77-84.

Monna F, Lancelot J, Croudace IW, Cundy AB, Lewis JT., 1997. Pb Isotopic Composition of Airborne Particulate Material from France and the Southern United Kingdom: Implications for Pb Pollution Sources in Urban Areas. *Environmental Science and Technology* 31: 2277-2286.

Morel, J.L. 1997. Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. - Chapter 6, In : pp 141-176, J. Tarradellas, G.Bitton and D. Rossel (eds.), *Soil Ecotoxicology*, Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, Fl.

Morel J.L., 1998. Dynamique des elements traces dans les sols : mobilite et transfert vers les eaux souterraines et les plantes. Dans : *Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion*. Académie des sciences, Rapport n°42, 67-126

Morin G., OstergrenJD., Juillot F., Ildefonse P., Calas G., Brown GE Jr., 1999. XAFS determination of the chemical form of lead in smelter-contaminated soils and mine tailings: Importance of adsorption processes. *American Mineralogist* 84: 420-434.

Neumann D., Römheld V., 1999. Root excretion of carboxylic acids and proton in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211: 121-130.

Niebes J.F., Hinsinger P., Jaillard B., Duffey J.E., 1993. Release of non exchangeable potassium from different size fractions of two highly K-fertilized soil in the rizosphere of rape (*Brassica napus* cv Drakkar). *Plant and soil*, 155/156: 403-406.

- Nriagu JO.**, 1978. The biogeochemistry of lead in the environment. Ed JO Nriagu, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Nriagu JO., Moore PB.**, 1984. Phosphate minerals Springer –Verlag, New-York.
- Nye PH.**, 1986. Acid-base changes in the rhizosphere. *Advance in Plant Nutrition* 2: 129-1253
- O'Reilly SE.**, 2002. Lead sorption efficiencies of natural and synthetic Mn and Fe-oxides. Dissertation submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 45p.
- Päivöke AEA.**, 2002. Soil lead alters phytase activity and mineral nutrient balance of *Pisum sativum*. *Environmental and Experimental Botany* 48: 61-73.
- Parys E., Romanowska E., Siedlecka M., Poskuta JW.**, 1998. The effects of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum* 20: 313-322.
- Patra M., Bhowmick N., Bandopadhyay B., Sharma A.**, 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 199-223.
- Pellet DM., Grunes DL., Kochian LV.**, 1995. Organic acid exudation as an aluminium tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196: 788-795.
- Pichard A.**, 2002. Plomb et ses dérivés. Fiche INERIS.
- Pichtel J., Kuroiwa K., Sawyerr HT.**, 2000. Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. *Environmental Pollution* 110: 171-178.
- Pourrut B., Perchet G., Silvestre J., Cecchi M., Guiresse M., Pinelli E.**, 2007. Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *Journal of Plant Physiology*, in press.
- Programme des nations unies pour l'environnement**: Conférence des parties à la convention de Bâle sur le contrôle des mouvements transfrontières de déchets dangereux et de leur élimination. Sixième réunion, Genève, 9-13 décembre 2002.
- Quevauviller P., Rauret G., Lopez-Sanchez J.F., Rubio R., Ure A., Muntau H.**, 1997. Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. *Science of the Total Environment*, 205, 223-234.
- Quian Y., Sturchio NC., Chiarello RP., Lyman PF., Lee TL., Bedzyk MJ.**, 1994. Lattice location of trace elements within minerals and at their surfaces with X-ray standing waves. *Science* 265: 1555-1557.
- Qun, D.C., Xiao, W.H.**, 1995. Cytogenetic toxic effects of heavy metals on *Vicia faba* and studies into the *Vicia* micronucleus. *Acta Bot. Sin.* 37, 14–24.
- Raksataya, M., Langdon, A.G., Kim, N.D.**, 1996. Assesment of the extend of lead redistribution during sequential extraction by two different methods. *Analytica Chimica Acta*, 332: 1-14.
- Rauser WE.**, 1990; Phytochelatins. *Annual Review of Biochemistry*, 59: 61-86.
- Rauser WE.**, 1995. Phytochelatins and related peptides. *Plant Physiology* 109: 1141-1149.
- Rauser WE.**, 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acides, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 31: 19-48.
- Renella G., Landi L., Nannipieri P.**, 2004. Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma* 122: 311-315.
- Rickard DT., Nriagu JE.**, 1978. Aqueous environmental chemistry of lead. In the *Biogeochemistry of lead in the environment* . Part A. Ecological Cycles. JO. Nriagu Eds. 219-284, Elsevier, North-Holland, New- New-York.
- Robert M.**, 1996. Le sol: interface pour l'environnement. Ressource pour le développement. Paris. Masson 244 p.
- Romheld V., Muller Ch., Marschner H.**, 1984. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant physiology* 76: 603-606.

Rooney CP., McLaren RG., Cresswell RJ., 1999. Distribution and phytoavailability of lead in a soil contaminated with lead shoot. *Water, Air and Soil Pollution* 116: 535-548.

Roselli. W., Keller. C., Boschi. K., 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on metal contaminated soil. *Plant and soil*, 256:265-272.

Ruley AT., Sharma NC., Sahi SV., Singh SR., Sajwan KS., 2006. Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. *Environmental Pollution* 144: 11-18.

Saby, N. and Arrouays, D., 2005. Simulation of the Use of a Soil-Monitoring Network to Verify Carbon Sequestration in Soils: Will Changes in Organic Carbon Stocks be Detectable? *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35 (17-18):2379–2396.

Salt DE., Blaylock M., Kumar NPBA., Dushenkov V., Ensley BD., Chet I., Raskin I., 1995. Phytoremediation : a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants of outstanding interest. *Bio-Technology* 13: 468-474.

Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., Harper JF., 2002. Calcium at the crossroad of signalling. *The Plant Cell* 14: 401-417.

Sarret G., Vangronsveld J., Manceau A., Musso M., D'Haden J., Menthonnex JJ., Hazemann JL., 2001. Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and absence of EDTA. *Environmental Science and Technology* 35: 2854-2859.

Sauvé S., McBride M., Hendershot W., 1998. Soil solution speciation of lead: effects of organic matter and pH. *Soil Science Society of America journal* 62: 618-621.

Sayer JA., Cotter-Howells JD., Watson C., Hilier S., Gadd GM., 1999. Lead mineral transformation by fungi. *Current Biology* 9: 691-694.

Scancar J., Milacic R., Horvat M., 2000. Comparison of various digestion and extraction procedure in an analysis of heavy metals in sediments. *Water, Air and Soil Pollution* 118: 87-99.

Schützendübel A., Polle A., 2002. Plant responses to abiotic stresses : heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53 (372), 1351-1365.

Schramel, O., Michalke, B., Kettrup, A., 2000. Study of the copper distribution in contaminated soils of hop fields by single and sequential extraction procedures. *Science of the Total Environment*, 263, 11-22.

Semlali R., 2000. Localisation, dynamique et estimation de flux d'éléments traces métalliques dans les sols. Thèse de doctorat de l'ENGREF, Paris, 112p.

Semlali RM, van Oort F, Denaix L, Loubet M., 2001. Estimating Distributions of Endogenous and Exogenous Pb in Soils by Using Pb Isotopic Ratios. *Environmental Science and Technology* 35: 4180-4188.

Seregin IV., Ivanov VB., 1998. The transport of cadmium and lead ions through root tissues. *Russian Journal of Plant Physiology* 45: 899-905.

Seregin IV., Ivanov VB., 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 48 (4): 523-544.

Seregin IV., Shpigun LK., Ivanov VB., 2004. Distribution and toxic effects of Cadmium and Lead on maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology* 51 (4): 525-533.

Shah K., Nongkynrih JM., 2007. Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia Plantarum* 51 (4): 618-634.

Sharma P., Dubey RS., 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17 (1): 35-52.

Shu WS., Ye ZH., Lan CY., Zhang ZQ., Wong MH., 2001. Acidification of lead/zinc mine tailing and its effects on heavy metal mobility. *Environment International* 26 (5-6): 389-394.

Shuman LM., 1985. Fractionation method for soil microelements. *Soil Science* 140: 11-22.

Shuman LM., 1998. Effects of organic waste amendments on cadmium and lead in soil fractions of two soils. *Community of Soil Science and plant analysis* 29: 2939-2952.

Sies H., 1991. Oxidative stress: introduction. In: Sies H. (ed), *Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, San Diego, I-XV, 650 p.

Song YF., Wilke BM., Song XY., Gong P., ZhouQX., Yang GF., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and heavy metals (HM) as well as their genotoxicity in soils after long-term wastewater irrigation. *Chemosphere* 65: 1859-1868.

Song YF., Gong P., Wilke BM., Zhang W., Song XY., Sun TH., Ackland ML., 2007. Genotoxicity assessment of soils from wastewater irrigation areas and bioremediation sites using the *Vicia faba* root tip micronucleus assay. *Journal of Environmental Monitoring* 9: 182-186.

Soubrand-Colin M., Neel C., Bril H., Grosbois C., Caner L., 2007. Geochemical behaviour of Ni, Cr, Cu, Zn and Pb in an Andosol–Cambisol climosequence on basaltic rocks in the French Massif Central. *Geoderma*, 137, 340–351.

Sparks, D.L., 1995. *Environmental soil chemistry*. Academic Press, New-York.

Sposito G., Lund L.J., Chang A.C., 1982. Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in solid phases. *Soil Science Society of America Journal*, 46, 260-264.

Sposito G., Prost R., Gaultier JP., 1983. Infrared spectroscopic study of adsorbed water on reduced-charge Na/Li montmorillonites. *Clays and clay minerals* 31: 9-16.

Sposito G., 1989. *The chemistry of soils*. Oxford University Press, New York.

Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C., Ecker S., Ma T., Horak O., Kundi M., Knasmüller S., 1998. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31, 183-191.

Sterckeman T., Douay F., Proix N., Fourrier H., 1996. Programme de Recherches Concertées: étude d'un secteur pollué par les métaux. Typologie et cartographie des sols, inventaires des polluants minéraux, étude de la migration verticale de Cd, Cu, Pb et Zn. Rapport Conseil Régional Nord-Pas de Calais. Secrétariat d'état à la recherche-ISA-INRA, Lille.

Sterckeman T., Douay F., Proix N., Fourrier H., 2000. Vertical distribution of Cd, Pb, and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* 107: 377-389.

Sterckeman T., Douay F., Baize D., Fourrier H., Proix N., Schwartz C., Carignan J., 2006. Trace element distributions in soils developed in loess deposits from northern France. *European Journal of Soil Science*, 57, 392-410.

Stevenson AJ., 1982. *Humus Chemistry*. John Wiley & Son, New York.

Sturchio NC., Chiarello RP., Cheng L., Lyman PF., Bedzyk MJ., Quian Y., You H., Yee D., Geissbuhler P., Sorensen LB., Liang Y., Baer DR., 1997. Lead adsorption at the calcite-water interface: synchrotron X-ray standing wave and X-ray reflectivity studies. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61 (2): 251-263.

Swaine DJ., 1986. Lead. In DC Adriano (éd), *Trace elements in the terrestrial environment*. Springer Verlag, New York.

Tanhan P., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Chaiyarat R., 2007. Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]. *Chemosphere* 68: 323-329.

Tatar E., Mihucz VG., Varga A., Zaray G., Cseh E., 1999. Effect of lead, nickel and vanadium contamination on organic acid transport in xylem sap of cucumber. *Journal of Inorganic Biochemistry* 75 : 219–223.

Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M., 1979. Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals. *Analytical Chemistry*, 51 (7), 844-851.

Teutsch N, Erel Y, Halicz L, Banin A., 2001 Distribution of natural and anthropogenic lead in Mediterranean soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65: 2853-2864.

- Tipping E., Fitch A., Stevenson FJ.**, 1995. Proton and copper binding by humic acid: application of a discrete-site/electrostatic ion-binding model. *European Journal of Soil Science* 46: 95-101.
- Tokalioglu S., Kartal S., Birol G.**, 2003. Application of a three-stage sequential extraction procedure for the determination of extractable metal content in highway soils. *Turkish Journal of Chemistry*. 27: 333-346.
- Tomaszewska B., Tukendorf A., Baralkiewicz D.**, 1996. The synthesis of phytochélatines in lupin root treated with lead ions. *The science of legumes* 3: 206-217.
- Tong YP., Kneer R., Zhu YG.**, 2004. Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science*: 9: 7-9.
- Tremel-Schaub A., Feix I.**, 2005. Contamination des sols. EDP Sciences & ADEME Edition, 413 p
- Tung G., Temple PJ.**, 1996. Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *The Science of the Total Environment* 188: 71-85.
- Ure, A.M., Davidson, C.M., Thomas, R.P.**, 1995. Single and sequential extraction schemes for trace metal speciation in soils and sediments. In: Quevauviller, P., Maier, E.A., Griepink, B. (Eds.). *Quality Assurance for environmental analysis (BCR)*, Elsevier pp. 505-523.
- Uzu G.**, 2007. Caractérisation des particules: résultats d'avancement au terme de 8 mois de thèse sur le thème spéciation, et phyto-disponibilité des particules PM 10 et PM2,5 riches en plomb dans le contexte de deux usines et de leurs environs. 33 pages.
- Vassil AD., Kapulnik Y., Raskin I., Salt DE.**, 1998. The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiology* 177: 447-453.
- Veeresh H., Tripathy S., Chaudhuri D., Hart BR.**, 2003. Sorption and distribution of adsorbed metals in three soils of India. *Applied Geochemistry* 18 (11): 1723-1731.
- Verkleij, JAC., Schat.H.**, 1990. Mechanisms of metal tolerance in plants. *Heavy metals tolerance in plants-evolutionary aspects*. CRC press, p179-193.
- Veron A, Flament P, Bertho ML, Alleman L, Flegel R, Hamelin B.**, 1999. Isotopic evidence of pollutant lead sources in Northwestern France. *Atmospheric Environment* 33: 3377-3388.
- Wang G., Su, MY., Chen YH., Lin, FF., Luo D., Gao SF.**, 2006. Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetables species in southeastern China. *Environmental pollution*, 144(1): 127-135.
- White PJ.**, 2000. Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 171-189.
- White PA., Claxton LD.**, 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research* 567: 227-345.
- Wojas S., Ruszczyńska A., Bulska E., Wojciechowski M., Antosiewicz DM.**, 2007. Ca^{2+} -dependant response to Pb^{2+} is regulated by LCT. *Environmental Pollution* 147: 584-592.
- Wong CSC, Li XD.**, 2004. Pb contamination and isotopic composition of urban soils in Hong Kong. *The Science of the Total Environment* 319: 185-195.
- Wozny A., Jereczynska E.**, 1991. The effects of lead on early stages of *Phaseolus vulgaris* L. growth in vitro conditions. *Biologica Plantarum* 33: 32-39.
- Wu Z., Gu Z., Wang X., Evans L., Guo H.**, 2003. Effects of organic acids on adsorption of lead onto montmorillonite, goethite and humic acid. *Environmental Pollution* 121: 469-475.
- Xie ZM., Huang CY.**, 1994. Relationships between lead zinc mine arsenic contents and rice tillering in soil-rice system. *Journal of Zhejiang Agricultural university*, 20: 67-71.
- Xiong, Z.T.**, 1997. Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L. *Environmental Pollution* 97: 275-279.

Yang X., Feng Y., He Z., Stoffella P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 339-353.

Yanqun Z., Yuan L., Schwartz C., Langlade L., Fan L., 2004. Accumulation of Pb, Cd, Cu and Zn in plants and hyperaccumulator choice in Lanping lead-zinc mine area, China. *Environment International*, 30: 567-576.

Yi H., Li L., 2007. Vicia root-micronucleus and sister chromatid exchange assays on the genotoxicity of selenium compounds. *Mutation Research* 630: 92-96.

Yoon J., Cao X., Zhou Q., Ma LQ., 2006. Accumulation of Pb, Cu and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *The Science of the Total Environment* 368: 456-464.

Zang Y., Zhong Y., Luo Y., Kong Z.M., 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 108 : 271-278.

Zhang FS., Ma J., Cao YP., 1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low molecular weight organic acids and utilisation of sparingly soluble inorganic phosphate by radish (*Raphanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants. *Plant and Soil* 196: 261-264.

Zhang PC., Ryan JA., 1998. Formation of pyromorphite in hydroxyapatite suspension under varying pH concentration. *Environmental Science and Technology* 32: 3318-3324.

Zheng N., Wang Q., Zheng D., 2007. Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc Plant in China via consumption of vegetables. *The Science of the Total Environment*, in press.

Zimdahl RL., Hassett JJ., 1977. Lead in soil. In *Lead in the environment*. W.R. Boggess and B.G. Wixson Eds., 93-98.

Annexes

Annexe 1 : Lead behaviour in a contaminated calcic cambisol profile.....	206
Annexe 2 : Study of lead speciation and behaviour in the soil-plant system. Case of <i>Pelargonium</i> and <i>Vicia Faba</i> cultivated on a contaminated calcareous soil.....	210
Annexe 3 : Composition de la solution de Hoagland	214

Annexe 1 : Lead behaviour in a contaminated calcic cambisol profile.

M. Cecchi¹, C. Dumat^{1,2}, P. Pradere³, R. Bidegain⁴, E. Pinelli¹ & M. Guiresse¹

1-INP-ENSAT Agronomy Environment Ecotoxicology Laboratory, BP 32607, Av de l'Agrobiopole, Castanet-Tolosan cedex, 31326, France.

2- Pierre et Marie Curie University, UFR 928, 4 place Jussieu, Paris cedex 05, 75251, France.

3-STCM, 11 route de Pithiviers, 45480 Bazoches Les Gallérandes, France.

4-Lara Europe Analyses, 1 impasse de Lisieux BP82553, 31025 Toulouse, France.

Due to its persistence and numerous uses, lead is one of the most common pollutants in the environment (Alkorta *et al.*, 2004) and it can induce negative effects on the health (Henry, 2000). More than its total concentration, it's the association of lead with the soil components (speciation in the large signification of the term or compartmentation) that governs its mobility and availability in the soil. In the context of risk assessment due to the industrial activities, we studied the associations of lead with majors and others trace elements (inorganic and organic) in a calcic cambic soil near a recycling batteries plant.

The studied soil is localized in the vicinity of a lead recycling plant (in activity since 1950) near Bazoches (45, France) and present a main lead contamination but others secondary Zn, Cu, Ni, As, Cr were also determined. A pedological global approach had been used to understand the behaviour of lead inside the soil profile. Physical (texture, clay minerals,..) and chemical (CEC, pH, SOM) soil properties. Total major (Al, Ca, Fe, Mn, Mg, P) and trace (As, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) elements had been determined by ICP-OES analysis after aqua regia digestion. In order to study the distribution of lead through the various soil fractions and in particular the available fraction, sequential chemical extraction had been performed. According to Leleyter & Probst (1998), the following fractions were separated: (1) soluble with water; (2) exchangeable with magnesium nitrate, (3) bound to carbonates (sodium acetate); (4) bound to the manganese oxides (hydroxylammonium chloride); (5) bound to amorphous iron oxides (ammonium oxalate and oxalate acid); (6) bound to crystalline iron oxides (ammonium oxalate acid and ascorbic acid) and (7) bound to organic matter (nitric acid hydrogen peroxide and ammonium acetate).

The calcic cambic soil studied presents an alkaline pH (between 7.2 and 8.8 from the top to the depth), a constant carbonate level (2.1%) and high clay fraction content (30 to 40 %). These factors could limit lead migration towards underground water. SOM and P (probably due to past amendments) present high values in the top soil and therefore could be the major carry phases for the lead. In particular the formation of lead-phosphates could reduce the availability.

Concerning major elements, Ca follows the carbonate profile, as a result, that soil contents calcium carbonates. On the opposite, Al, Fe, Mg and Mn follow clay profile with little influence of organic matter on top soil.

High lead concentration occurs in the top soil (1932 mg lead.kg⁻¹ soil in the 0-10 cm horizon). These lead amount decrease quickly with depth and the background concentration is reached at 50

cm. In the first 50 cm anthropogenic lead is probably associated with organic matter ($R^2 = 0.96$). According to Gavalda (2001), after 60 cm depth, the native lead is mainly associated with iron oxides ($R^2 = 0.7$). Moreover, $Mg(NO_3)_2$ extraction performed on the top soil demonstrated a relatively high availability of the lead (4 mg lead.kg⁻¹ soil) which underlines a transfer risk into the trophic chain. For the others trace elements, As, Cu and Zn have a behaviour close to that of lead. They are bound to iron only from 40 cm depth ($R^2 = 0.94$ for As, 0.96 for Cu and 0.99 for Zn). These trace elements undergo a soil organic matter influence, as a consequence, an anthropogenic contamination in the first 40 cm can be deduced. Contrary to this data, Ni and Cr are bound to iron oxides along profile ($R^2 = 0.99$ for Cr and 0.93 for Ni) so, no contamination in these elements can be highlighted.

The continuation of work must specify the bioavailability of lead for the ecosystems by using some plants (tomato, broad bean, salad and pelargonium). Experiments of microculture in controlled condition (Guivarch and al, 1999) will be carried out in growth chambers on soil of the factory like in fields. They make it possible to evaluate the risks of transfer of the lead of this soil towards the plants. Combining EXAFS results with complementary analyses by Micro-SXRF and non-synchrotron-based techniques (XRD, SEM-EDS, toxicity tests, chemical extractions and DGT) will provide to determine the mechanisms of lead transport and stocking in the plants. The primary benefit of our work will be improvement of the scientific basis for risk assessment and remediation design for this toxic element.

References

- Alkorta, I., Hernandez-Allica, J. Becerril, J.M., Amezcaga, I., Albizu, & Garbizu, I. 2004. Recent findings of the remediation of soil contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. In: Environmental Science and Bio/Technology, 3, 71-90.
- Bertin C., Yang X. & Weston L.A. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant Soil, 256, 67-83.
- Dakora F.D. & Phillips D.A. 2002. Root exsudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant and Soil, 245, 35-47.
- Gavalda D. Devenir des éléments traces métalliques dans les boubènes (luvi-redoxisol) après épandage de boues granulées. Thèse de doctorat, INP-ENSAT, 2001, 258p.
- Guivarch A., Hinsinger P. & Staunton S. 1999. Root uptake and distribution of radiocaesium from contaminated soils and the enhancement of Cs adsorption in the rhizosphere. Plant and Soil, 211, 131-138.
- Henry J.R. 2000. An overview of the phytoremediation of lead and mercury. National Network of environmental management studies, OS-EPA.
- Leleyter L and Probst JL, 1998. A new sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace element in river sediments. Intern. J. Environ. Anal. Chem 73(2): 109-128.
- Liu H., Probst A. & Liao B. 2005. Metal contamination of soils and crops affected by the Chenzhou Lead/Zinc mine spill (Hunan, China). The Science of the Total Environment, 339, 1-3, 153-166.

Liu H., Probst A. & Liao B. Bioavailability of heavy metals from mine tailing contaminated substrates to *Vicia faba* L. J. Forest, Snow and Landscape Research (submitted).

Panich-Pat, T., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Seinives, P., Lanza, G.R. 2003. Removal of lead from contaminated soils by *Typha angustifolia*. Water, Air, and soil Pollution, 155, 159-171, 2004.



Lead behavior in a contaminated calcic cambisol profile

M. CECCHI⁽¹⁾, C. DUMAT⁽¹⁾, P. PRADERE⁽²⁾, R. BIDEGAIN⁽³⁾, J.C. REVEL⁽¹⁾, E. PINELLI⁽¹⁾ & M. GUIRESSE⁽¹⁾

(1) INP-ENSAT Laboratory AEE avenue de l'Agrobiopole BP 32607 Castanet Tolosane 31326 France. Email: marie.cecchi@ensat.fr

(2) STCM 11 route de Pithiviers Bazoches-les-Gallierandes 45480 France

(3) LARA Europe Analyzes 1 impasse de Lisieux BP 82553 Toulouse 31025 France

Context

In the context of risk assessment due to the industrial activities, we studied the association of lead with major & trace elements in a calcic cambic soil near a recycling batteries plant. Speciation of lead was studied in field and laboratory experiments, in function of depth.

Materials & methods

The studied soil is located in the vicinity of a lead recycling plant in Bazoches (45, north of France). Samples were collected every 10 cm, from the top to 130 cm depth.

1-Pedological global approach

Texture, clay mineral, CEC, pH, SOM

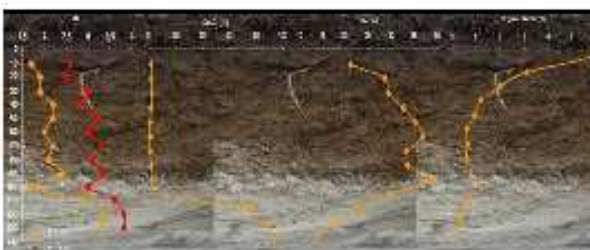
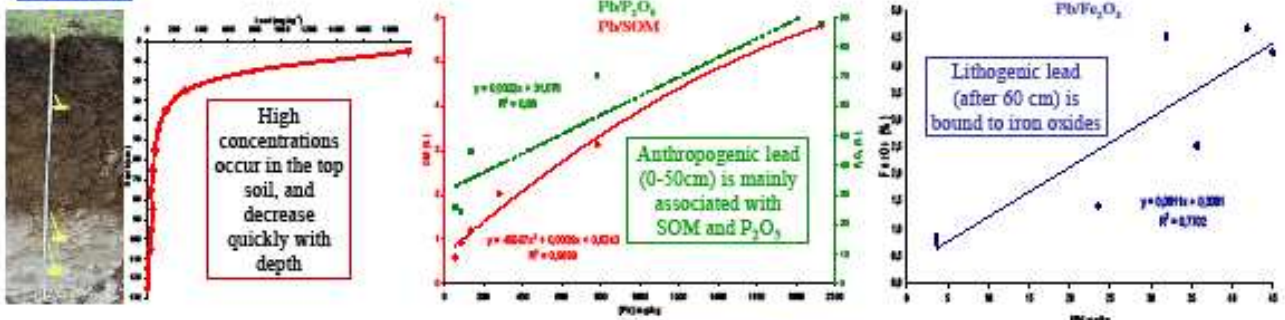
2-Aqua regia digestion

Determination of pseudo-total major (Al, Ca, Fe, Mn, Mg, P) & trace (As, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) elements concentration

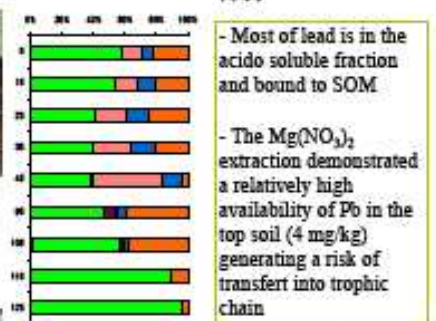
3-Sequential extractions

Distribution of lead in the soil profile and determination of the available fraction

Results



The alkaline pH and constant $CaCO_3$ level, high clay, SOM&P contents could limit lead migration and availability



Other results – Conclusions – Perspectives

- As, Cu, Zn have a behavior close to lead one: an anthropogenic contamination in the first 40 cm with high influence of SOM and deeper of iron oxides.
- Ni and Cr are bound to iron oxides along all the profile, meaning that there is no contamination.
- Migration of lead is reduced by soil characteristics but the exchangeable fraction for the top soil is relatively high.
- Perspectives:
 - evaluation of soil to plant transfer with microcultures in order to study the rhizosphere of various vegetables.
 - determination of lead transport mechanism by complementary techniques: microscopy, spectroscopy, DGT...

18th World Congress of Soil Science. Philadelphia July 9th-18th 2006

Annexe 2 : Study of lead speciation and behaviour in the soil-plant system. Case of *Pelargonium* and *Vicia Faba* cultivated on a contaminated calcareous soil.

M. Cecchi¹, C. Dumat^{1,2}, P. Pradere³, B. Felix-Faure⁴, J. Sylvestre¹, M. Kaemmerer¹, E. Pinelli¹ & M. Guiesse¹

1-Laboratoire Environnement Ecotoxicologie, EA 3715 INP-ENSAT, PO box 107, Auzeville-Tolosane, Avenue de l'Agrobiopole, Castanet-Tolosan cedex, 31326, France.

2-Université Pierre et Marie Curie, UFR 928, 4 place Jussieu, Paris cedex 05, 75251, France.

3-STCM, 30-32 Av. de Fondère, 31200 Toulouse

4-Lara Europe Analyses, 1 impasse de Lisieux, B.P. 82553, 31025 Toulouse Cedex 3.

Scientific background and objectives

Due to its persistence and numerous uses, lead is one of the most common pollutants in the environment (Alkorta *et al.*, 2004) and it can induce negative effects on the health (Henry, 2000). Some plants present a high Pb sensitivity and could be used as bio indicator of toxicity (Liu *et al.*, 2005). On the opposite, others can accumulate large quantities of Pb and could be used in remediation processes (Panich-Pat *et al.*, 2003). However little is known actually on the involved mechanisms concerning toxicity or resistance of plants to Pb.

The speciation of Pb governs its mobility in the soil, its absorption (or adsorption or sequestration), then its translocation (or stoking in the vacuoles for instance) and finally its toxicity. Both soil (physic and chemical parameters) and plant characteristics (species, variety and maturity) influence metal speciation. Producing exudates, the plants can modify the physical, chemical and biological characteristics of its near environment (Bertin *et al.*, 2003) and consecutively the behaviour of metals (Dakora & Phillips, 2002). The determination of metal speciation from the soil to the plant is therefore a key data in order to progress in the comprehension of the phenomenon (plant contamination and soil remediation).

Material and Methods

The calcareous polluted soil ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 7.9$) is localized in the vicinity of a lead recycling factory near Bazoches (58, France). A detailed study of lead behaviour throughout the contaminated soil profile was realised in order to determine the interactions between trace metals and soil components and estimate the risk for the underground waters. Physical (texture, clay minerals,...) and chemical (CEC, pH, SOM) soil properties were studied. Total major (Al, Ca, Fe, Mn, Mg, P) and trace (As, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) elements had been determined by ICP-OES analysis after aqua regia digestion. The distribution of lead through the various soil fractions was performed by sequential chemical extraction. According to Leleyter & Probst (1998), the following fractions were separated: (1) soluble with water; (2) exchangeable with magnesium nitrate, (3) bound to carbonates (sodium acetate); (4) bound to the manganese oxides (hydroxylammonium chloride); (5) bound to amorphous iron oxides (ammonium oxalate and oxalate acid); (6) bound to crystalline iron oxides (ammonium oxalate acid and ascorbic acid) and (7) bound to organic matter (nitric acid hydrogen peroxide and ammonium acetate). Culture

experiments of various *Pelargonium* cultivars and *Vicia Faba* were realised both in the field and in the laboratory using an experimental device that permit to obtain rhizosphere soil and roots without soil contamination (Guivarch *et al.*, 1999).

Results

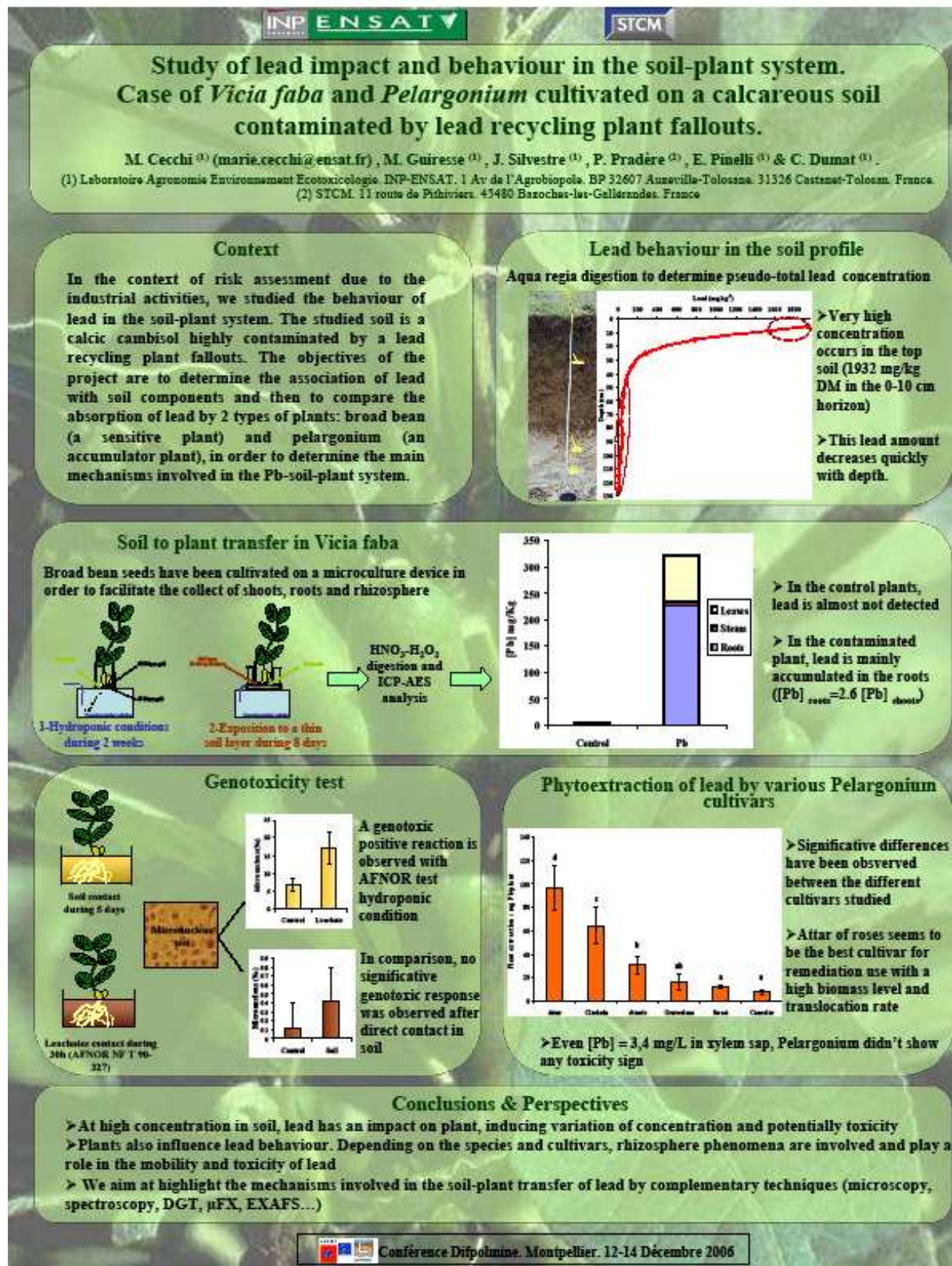
The calcic cambic soil studied presents an alkaline pH (between 7.2 and 8.8 from the top to the depth), a constant carbonate level (2.1%) and high clay fraction content (30 to 40 %). These factors could limit lead migration towards underground water. SOM and P (probably due to past amendments) present high values in the top soil and therefore could be the major carry phases for the lead. In particular the formation of lead-phosphates could reduce the availability. Concerning major elements, Ca follows the carbonate profile, as a result, that soil contents calcium carbonates. On the opposite, Al, Fe, Mg and Mn follow clay profile with little influence of organic matter on top soil. High lead concentration occurs in the top soil (1932 mg lead.kg⁻¹ soil in the 0-10 cm horizon). These lead amount decreases quickly with depth and the background concentration is reached at 50 cm. In the first 50 cm anthropogenic lead is probably associated with organic matter ($R^2 = 0.96$). According to Gavalda (2001), after 60 cm depth, the native lead is mainly associated with iron oxides ($R^2 = 0.7$). Moreover, Mg(NO₃)₂ extraction performed on the top soil demonstrated a relatively high availability of the lead (4 mg lead.kg⁻¹ soil) which underlines a transfer risk into the trophic chain. The behaviour of As, Cu and Zn is close to that of lead. They are bound to iron after 40 cm depth only ($R^2 = 0.94$ for As, 0.96 for Cu and 0.99 for Zn). These trace elements undergo a soil organic matter influence, as a consequence, an anthropogenic contamination in the first 40 cm can be deduced. At the reverse side, Ni and Cr are bound to iron oxides along the whole profile ($R^2 = 0.99$ for Cr and 0.93 for Ni) suggesting a natural origin.

From the field experiments, we selected the Attar of Rose *Pelargonium* cultivar that offers high biomass level and translocation rate needed for remediation use: 1477 ± 50 (mgPb/kg DW soil). Moreover its crops could be exploited through the production of essential oils. With a lead concentration in its xylem sap of 3.4 mg/L, that cultivar doesn't show any toxicity sign as measured by micro-nucleus or oxidative stress tests. But as the lead concentration increases a hardening of its root tissues was observed, suggesting perhaps a replacing of the Ca²⁺ ions by Pb²⁺ ions (like in the human bones). Moreover, Morard *et al.* (2000) observed the remobilisation of calcium from the apex zone for stressed tomatoes. At the reverse side *Vicia Faba* strongly reacts during bio toxicity tests, moreover with a lead xylem sap concentration of 3.2 mg/L, dark colour grains were observed when the xylem sap was air exposed.

Perspectives

According to the preliminary observations, we propose to study by various complementary techniques (XRD, SEM-EDS, toxicity tests, chemical extractions, DGT, Micro-SXRF and EXAFS) the speciation of lead in the roots, xylem sap and aerial parts samples of *Vicia Faba* and Attar of Rose *Pelargonium*. The samples will be prepared taking care of minimize the risk of speciation modification. For instance the freeze-drying will be avoided and the xylem sap samples will be extracted under inert gas (Ar) and stored in a sealed quartz capillary (inner diameter = 3 mm, with minimum death volume)

in frozen state. Xylem sap samples will be also concentrated after deposit on a quartz sheet and evaporation and analysed with SEM-EDS technique. Various specific zones of leaves and roots samples will be separated and then frozen. Due to the low Pb levels in some samples studied, detection and quantitative analysis of lead species will only be achievable by EXAFS spectroscopy.



Annexe 3 : Composition de la solution de Hoagland

KNO ₃	5 mM
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	5 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
Tartrate de fer	9 µM

Le plomb est un métal toxique exploité depuis près de 5000 ans, dont l'usage s'est largement accentué avec la révolution industrielle. En raison de ses très nombreuses utilisations, il a largement été répandu dans l'environnement. Même si les rejets de plomb sont contrôlés de nos jours (directives cadre européennes sur l'eau et les sols, réglementation REACH), il est toujours utilisé, notamment pour la fabrication des batteries. Les sols contaminés au plomb sont très nombreux, et sa persistance représente un problème environnemental majeur, notamment en raison de sa toxicité vis-à-vis des écosystèmes. Dans ce contexte, le comportement du plomb a été étudié le long d'un profil de sol dans l'enceinte d'une usine de recyclage du plomb grâce à une approche pédologique globale. Ce sol présente une forte contamination en surface (près de 2000 mg.kg⁻¹), avec une migration du plomb issus des retombées atmosphériques de l'usine jusqu'à 60 cm de profondeur environ. Les signatures isotopiques proches de celles retrouvées autour d'une usine de métallurgie, combinées à des facteurs d'enrichissement et des pourcentages de plomb anthropique élevés en surface confirment ces constatations. Cette contamination en plomb s'accompagne d'une contamination en autres métaux, sous produits du process de l'usine (Sb, Sn, As, Cu et Zn). Les extractions séquentielles ont montré que le plomb anthropique est majoritairement lié aux carbonates, alors que le plomb naturel est plutôt lié aux oxydes de fer. De plus, l'existence d'une fraction échangeable importante souligne un risque potentiel de transfert du plomb vers la chaîne trophique. La phytodisponibilité de ce plomb a été évaluée à l'aide d'un dispositif de microculture sur la fève et la tomate. En huit jours d'exposition, aucune phytotoxicité n'a été mise en évidence. Ces expériences ont cependant montré un important transfert du plomb vers les racines, avec une majeure partie adsorbée. Par contre, la translocation du plomb vers les parties aériennes est limitée, démontrant une aptitude des plantes à séquestrer le plomb dans les racines. Ces expériences ont aussi montré que les racines des plantes avaient une forte influence sur le sol qui les entoure, en provoquant une importante diminution du pH, qui a pour conséquence une diminution de la fraction liée aux carbonates accompagnée d'une forte augmentation de la fraction échangeable. Enfin dans une partie plus exploratoire, nous avons comparé une mode de culture largement utilisé en laboratoire (hydroponie) avec l'exposition directe en sol, plus proche des conditions naturelles. Le sol contaminé se révèle génotoxique dans les deux cas, mais avec des amplitudes différentes dans la réponse. Les transferts du plomb vers les racines sont équivalents, mais la translocation vers les feuilles est plus importante dans le cas de l'exposition directe au sol. Cette translocation est accompagnée de teneurs plus élevées en plomb (total et libre) dans la sève.

Mots-clés : *Vicia faba*, *Lycopersicon esculentum*, plomb, compartimentation, extractions séquentielles, rhizosphère, transfert, génotoxicité, sol brun calcaire.